



## **Detección y viabilidad de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogotá**



**Fidson Juarismy Vesga Pérez**  
Mayo de 2018



Directoras PUJ

**Dra. Alba Alicia Trespacios, PhD.**

**Dra. Claudia Campos, PhD.**

Directoras UPV

**Dra. Dña. Yolanda Moreno Trigós**

**Dra. Dña. M<sup>a</sup> Antonia Ferrús Pérez**

Imagen tomada de: <https://www.servidigest.com/helicobacter-pylori-gastritis/?lang=en>

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Universitat Politècnica de València**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biotecnología**

**Doctorado en Ciencias Biológicas**

**Doctorado en Biotecnología**



**Detección y viabilidad de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogotá**

**FIDSON JUARISMY VESGA PÉREZ**

**Tesis Doctoral**

Directoras PUJ

**Dra. Alba Alicia Trespalacios, PhD.**

**Dra. Claudia Campos, PhD.**

Directoras UPV

**Dra. Dña. Yolanda Moreno Trigos**

**Dra. Dña. M<sup>a</sup> Antonia Ferrús Pérez**

**Bogotá (Colombia), Valencia (España), Mayo 2018**

## **NOTA**

“Esta tesis doctoral se ha realizado teniendo en cuenta las bases establecidas en el convenio de cooperación para la cotutela de tesis doctorales conducente al doble título de doctor firmado entre las dos universidades”.

Por la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia), título de doctor en Ciencias Biológicas y por la Universitat Politècnica de València (Valencia, España), título de doctor en Biotecnología.

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946.

Pontificia Universidad Javeriana.

*“Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido.  
Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos”.*  
Marie Curie.

*A mi amado esposo,  
quien fue el motor de arranque en esta etapa,  
pero tuvo que partir  
en el mejor momento de nuestras vidas.*

*A mi familia  
quienes en esta  
dura etapa,  
se matricularon conmigo.*

## **AGRACECIMIENTOS**

Ha llegado el momento de escribir la última página de esta historia y enfrentarme a la dura tarea de agradecer a todos aquellos que con su cariño y apoyo y de una u otra forma han hecho parte de este proceso.

A Dios y a la Virgen por darme fortaleza, paciencia y sabiduría para llevar a feliz termino este trabajo y poder hacer realidad este sueño.

A mis cuatro tutoras de tesis, Alba Alicia, Claudia, María Antonia y Yolanda por sus valiosos consejos, por su disposición para asumir esta ardua tarea, por la confianza que han depositado en mis ideas y en mi trabajo. Por haberme inculcado la mentalidad que se puede ser cada vez mejor en lo que se hace, pensando siempre en grande, pero con los pies sobre la tierra. Pero, sobre todo, mil gracias por el ejemplo, el cariño sincero y el apoyo que me han brindado desde el primer día, esto ha sido fundamental en mi crecimiento no sólo profesional sino también personal.

A mis compañeros, pero sobre todo amigos de cada uno de los grupos de investigación tanto de la Javeriana como de la Politecnica que han hecho parte de mi vida en este largo camino, algunos ahora los tengo lejos otros aun a mi lado, pero todos han dejado una huella importante en mi corazón y mi vida. Gracias por grandes momentos de risas, de compartir momentos de tristeza y dolor, por celebrar los pequeños y grandes triunfos durante estos años, en pocas palabras gracias totales.

A Camilo, Eliana, Paola C., Linita L., Luis, Azucena, Paola B., Paola R., Heidy, Marcela, Sandrita, Nury, Patricia A. y a todos aquellos que han aportado su granito de arena, para que esta parte de mi vida en la Javeriana haya sido maravillosa.

A José Luis e Inma, por haberme acogido en el IIAMA como un miembro más desde el primer día y hacerme sentir como en mi casa aún estando a más de 8.000 km de distancia de ella.

A Irene H., Rut, Jeisson, Paula B., Irene C., Laura, Paula S., Andres, Jorge y todos aquellos que han estado en esta etapa del camino a mi lado en Valencia, muchas gracias por hacer que mi estancia en esta ciudad fuera algo mas que sólo trabajo y estudio. Me llevo en el corazón muy bellos momentos compartidos con todos ustedes.

A Nubia, Mireya, Carlos, Tulio, Adriana y todas las personas del Acueducto de Bogotá que estuvieron siempre muy atentos a prestar todo su apoyo y colaboración en los muestreos durante este largo proceso de investigación.

Y finalmente, agradezco a quienes han sido mi pilar y apoyo siempre, mi bella y amada familia, quienes han apoyado continuamente todas mis decisiones, me han inculcado que nada en la vida es fácil, pero que con trabajo constante y esfuerzo siempre se consiguen las metas trazadas y así cumplir los sueños, la gran motivación que me ha traído hasta aquí.

De corazón para todos mil y un millón de gracias por todo.

La realización de ésta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos:

“Evaluación de la presencia de *Helicobacter pylori* en aguas potables y residuales en la ciudad de Bogotá (COD. 120356933870, Contrato: 642-2013)”. COLCIENCIAS (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación), Colombia.

“*Helicobacter pylori* y otros helicobacters patógenos en aguas y alimentos: Desarrollo y aplicación de herramientas moleculares dirigidas a la evaluación del riesgo para el consumidor (REF. AGL2014-53875-R)”. Ministerio de Economía y Competitividad, España.

## INDICE GENERAL

### Abreviaturas

<b>Resumen</b>	I
<b>Abstract - Resumen en Inglés</b>	II
<b>Resum – Resumen en Valenciano</b>	III
<b>Capítulo 1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	1
<b>Capítulo 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	5
2.1. Contaminación del agua por microorganismos patógenos	6
2.2. El agua como vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas	7
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> , patógeno acuático emergente	11
2.3.1. Antecedentes históricos y situación taxonómica actual	11
2.3.2. Morfología y características fisiológicas del género <i>Helicobacter</i>	14
2.3.2.1. Características de <i>Helicobacter pylori</i>	14
2.3.2.2. Factores de Patogenicidad de <i>H. pylori</i>	17
2.3.2.3. Transmisión de <i>H. pylori</i>	21
2.3.2.4. El agua como una fuente de transmisión de la infección por <i>H. pylori</i>	23
2.3.3. Estrategias de concentración de <i>H. pylori</i>	24
2.3.3.1. Centrifugación	24
2.3.3.2. Filtración	25
2.3.3.3. Separación Inmunomagnética (SIM)	25
2.3.4. Técnicas para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> en aguas	27
2.3.4.1. Detección y aislamiento por cultivo	27 30

2.3.4.2.	Técnicas Moleculares	
2.3.4.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa - PCR	30
2.3.4.2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa - qPCR	32
2.3.4.2.3.	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	38
<b>Capítulo 3. OBJETIVOS</b>		41
<b>Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>		43
4.1.	CEPAS BACTERIANAS	44
4.1.1.	Condiciones de cultivo de las cepas de referencia	45
4.2.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	45
4.2.1.	Estaciones de muestreo – Plantas de Tratamiento de Agua Potable (PTAP)	45
4.2.1.1.	PTAP 1	45
4.2.1.2.	PTAP 2	46
4.2.1.3.	PTAP 3	46
4.2.2.	Toma de muestra	46
4.2.2.1.	Toma de muestra de Agua Potable	47
4.2.2.1.1.	Toma de muestras de 1000 y 500 mL de agua potable para análisis de coliformes totales, <i>E. coli</i> y esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor	47
4.2.2.1.2.	Toma de la muestra de agua potable utilizando el método del “hisopo de Moore”, para el análisis de <i>H. pylori</i>	48
4.2.2.2.	Toma de muestra de agua cruda, para análisis de coliformes totales, <i>E. coli</i> , esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor y <i>H. pylori</i>	48
4.3.	CONCENTRACIÓN DE <i>H. pylori</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA	50
4.3.1.	Centrifugación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda	50

4.3.2.	Recuperación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable	
4.3.3.	Concentración de <i>H. pylori</i> por separación inmunomagnética – SIM	50
4.4.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> por CULTIVO A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA	52
4.4.1.	Puesta a punto del método de cultivo para detección y determinación de la viabilidad de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	52
4.4.2.	Metodología del cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	54
4.4.2.1.	Cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda	54
4.4.2.2.	Cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable	55
4.4.3.	Identificación molecular de las colonias de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua.	57
4.5.	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA CRUDA Y POTABLE MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES - PCR, qPCR y FISH	57
4.5.1.	Puesta a punto de los métodos moleculares para la detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	57
4.5.1.1.	Aislamiento del ADN genómico bacteriano a partir de muestras de agua	57
4.5.1.2.	Puesta a punto de la PCR convencional para detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> en muestras de agua	58
4.5.2.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda y potable mediante PCR, qPCR y FISH	59
4.5.2.1.	Extracción de ADN genómico a partir de las muestras de agua	59
4.5.2.2.	Detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> presente en el agua por PCR convencional mediante la amplificación de los genes <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>glmM</i> y <i>vacA</i>	60
4.5.2.3.	Confirmación de la presencia de <i>H. pylori</i> mediante secuenciación de los productos de PCR del gen <i>vacA</i> y análisis bioinformático	61
4.5.2.4.	Detección y cuantificación de <i>H. pylori</i> presente en el agua mediante la amplificación del gen <i>vacA</i> por qPCR	63

4.5.2.5.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	66
4.5.2.5.1.	Fijación de las muestras	67
4.5.2.5.2.	Hibridación <i>In situ</i>	67
4.6.	ANÁLISIS DE INDICADORES BACTERIANOS DE ORIGEN FECAL EN AGUAS	68
4.6.1.	Técnica de filtración por membrana para la cuantificación de coliformes totales y <i>E. coli</i> en aguas potables y crudas - ISO 9308-1 (2014)	69
4.6.2.	Técnica de filtración por membrana para la cuantificación de esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor en aguas potables y crudas - ISO 6461-2 (1986)	69
4.7.	Análisis de parámetros fisicoquímicos en aguas	70
4.8.	Análisis estadístico	70
<b>Capítulo 5. RESULTADOS</b>		<b>72</b>
5.1.	DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE <i>Helicobacter pylori</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA	73
5.1.1.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda por cultivo	74
5.1.1.1.	Puesta a punto de la PCR convencional para la detección y genotipificación de <i>H. pylori</i>	77
5.1.1.2.	Identificación genotípica de los cultivos presentes en el agua cruda	79
5.1.2.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable por cultivo	89
5.1.2.1.	Identificación genotípica de los cultivos presentes en el agua potable	90
5.2.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda y potable mediante métodos moleculares	99
5.2.1.	Detección de <i>H. pylori</i> en aguas crudas y potables por PCR convencional	99

5.2.2.	Caracterización genotípica y secuenciación de <i>H. pylori</i> en las tres plantas de potabilización estudiadas	101
5.2.2.1.	Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> en la PTAP 1	101
5.2.2.2.	Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> en la PTAP 2	103
5.2.2.3.	Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> en la planta PTAP 3	104
5.2.3.	Detección y cuantificación de <i>H. pylori</i> por qPCR	106
5.3.	Cuantificación de indicadores bacterianos de origen fecal en aguas crudas y potables	111
5.3.1.	Cuantificación de los Indicadores de contaminación fecal en agua cruda	111
5.3.2.	Cuantificación de los Indicadores de contaminación fecal en agua potable	115
5.4.	Análisis de parámetros fisicoquímicos en aguas crudas y potables	116
<b>Capítulo 6. DISCUSIÓN</b>		119
<b>Capítulo 7. CONCLUSIONES</b>		138
<b>Capítulo 8. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES</b>		141
<b>Publicaciones y presentaciones en congresos</b>		142
<b>Bibliografía</b>		144
<b>Anexos</b>		171

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies intestinales del género <i>Helicobacter</i>	12
<b>Tabla 2.</b> Especies gástricas del género <i>Helicobacter</i>	13
<b>Tabla 3.</b> Cepas utilizadas en el estudio	44
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de los iniciadores para amplificación de los genes <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacA</i> ( <i>s1/s2</i> y <i>m1/m2</i> ) y <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i> por PCR	61
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de la PCR para la amplificación el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	62
<b>Tabla 6.</b> Secuencias de los iniciadores del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	63
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de la qPCR para la detección de <i>H. pylori</i>	64
<b>Tabla 8.</b> Secuencia de las sondas LNA-HPY y EUB338	66
<b>Tabla 9.</b> Parámetros fisicoquímicos analizados en el estudio	70
<b>Tabla 10.</b> Detección presuntiva de <i>H. pylori</i> mediante las tres estrategias de cultivo para muestras de agua cruda	76
<b>Tabla 11.</b> Condiciones óptimas de la PCR para amplificación de los genes <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacA</i> ( <i>s1/s2</i> y <i>m1/m2</i> ) y <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i> .	77
<b>Tabla 12.</b> Detección e identificación de <i>H. pylori</i> en el agua cruda en las tres plantas de potabilización por el método de cultivo	82
<b>Tabla 13.</b> Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> en agua cruda en la PTAP 1	83
<b>Tabla 14.</b> Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> en agua cruda en la PTAP 2	85
<b>Tabla 15.</b> Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> en agua cruda en la PTAP 3	87
<b>Tabla 16.</b> Detección presuntiva de <i>H. pylori</i> mediante las tres estrategias de cultivo para muestras de agua potable	90
<b>Tabla 17.</b> Detección e identificación de <i>H. pylori</i> en el agua potable en las tres plantas de potabilización por el método de cultivo	92

<b>Tabla 18.</b> Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> en agua potable en la PTAP 1	93
<b>Tabla 19.</b> Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> en agua potable en la PTAP 2	95
<b>Tabla 20.</b> Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> en agua potable en la PTAP 3	97
<b>Tabla 21.</b> Detección de <i>H. pylori</i> en el agua cruda en las tres plantas de potabilización por PCR	100
<b>Tabla 22.</b> Detección de <i>H. pylori</i> en el agua potable en las tres plantas de potabilización por PCR	101
<b>Tabla 23.</b> Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> presente en el agua cruda de la PTAP 1	102
<b>Tabla 24.</b> Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> presente en el agua potable de la PTAP 1	102
<b>Tabla 25.</b> Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> presente en el agua cruda de la PTAP 2	103
<b>Tabla 26.</b> Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> presente en el agua potable de la PTAP 2	103
<b>Tabla 27.</b> Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> presente en el agua cruda de la PTAP 3	104
<b>Tabla 28.</b> Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> presente en el agua potable de la PTAP 3	105
<b>Tabla 29.</b> Genotipo y genes presentes en el agua cruda y potable de las 3 plantas potabilizadoras	106
<b>Tabla 30.</b> Detección y cuantificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> por qPCR	108
<b>Tabla 31.</b> Cuantificación de coliformes totales, <i>E. coli</i> y esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor en el agua cruda de las tres plantas de tratamiento	113
<b>Tabla 32.</b> Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de coliformes totales, <i>E. coli</i> y esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor y la presencia de <i>H. pylori</i> en agua cruda en las tres plantas de potabilización	115
<b>Tabla 33.</b> Cuantificación de coliformes totales, <i>E. coli</i> y esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor en el agua potable de las tres plantas de potabilización	115

<b>Tabla 34.</b> Análisis de turbidez, conductividad y pH en el agua cruda de las tres plantas de tratamiento	116
<b>Tabla 35.</b> Análisis de turbidez, conductividad, pH y cloro residual en el agua potable de las tres plantas de tratamiento	117
<b>Tabla 36.</b> Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de los parámetros fisicoquímicos y la presencia de <i>H. pylori</i> en agua cruda en las tres plantas de potabilización	118
<b>Tabla 37.</b> Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de los parámetros fisicoquímicos y la presencia de <i>H. pylori</i> en agua potable en las tres plantas de potabilización	118
<b>Tabla 38.</b> Resultados de los análisis para la detección de <i>H. pylori</i> en el agua cruda y potable de la PTAP 1	185
<b>Tabla 39.</b> Resultados de los análisis para la detección de <i>H. pylori</i> en el agua cruda y potable de la PTAP 2	188
<b>Tabla 40.</b> Resultados de los análisis para la detección de <i>H. pylori</i> en el agua cruda y potable de la PTAP 3	191
<b>Tabla 41.</b> Resultados de los análisis de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en agua cruda y potable de la PTAP 1	194
<b>Tabla 42.</b> Resultados de los análisis de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en agua cruda y potable de la PTAP 2	197
<b>Tabla 43.</b> Resultados de los análisis de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en agua cruda y potable de la PTAP 3	200
<b>Tabla 44.</b> Resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos en agua cruda y potable de la PTAP 1	203
<b>Tabla 45.</b> Resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos en agua cruda y potable de la PTAP 2	206
<b>Tabla 46.</b> Resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos en agua cruda y potable de la PTAP 3	219

INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Presentación esquemática del gen <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i>	19
<b>Figura 2.</b> Isla de patogenicidad de <i>H. pylori</i>	21
<b>Figura 3.</b> Distribución de la infección de <i>H. pylori</i> en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico	22
<b>Figura 4.</b> Diagrama de la separación inmunomagnética	27
<b>Figura 5.</b> Representación gráfica del aumento de la fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de $C_T$	33
<b>Figura 6.</b> LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System	35
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción del SYBR Green I	37
<b>Figura 8.</b> Estructura del monómero de LNA	40
<b>Figura 9.</b> Metodología para la toma de muestras de agua potable y cruda.	47
<b>Figura 10.</b> “Hisopo de Moore” utilizado para la toma de muestra de <i>H. pylori</i> en agua potable	48
<b>Figura 11.</b> Toma de muestras de agua potable y cruda	49
<b>Figura 12.</b> Metodología de cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda	55
<b>Figura 13.</b> Metodología de cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable	56
<b>Figura 14.</b> Metodología para la obtención del ADN genómico a partir de las muestras de agua cruda y potable	60
<b>Figura 15.</b> Gráfica de detección y cuantificación de <i>H. pylori</i> por qPCR. (A) Curva que muestra el pico de temperatura de fusión ( $T_m$ ) para el fragmento del gen <i>vacA</i> amplificado. (B) Curva de amplificación del gen <i>vacA</i>	64
<b>Figura 16.</b> Crecimiento de colonias de <i>H. pylori</i> NCTC 11637 en Agar Brucella Suplementado	73
<b>Figura 17.</b> Límite de detección de <i>H. pylori</i> NCTC 11637 sobre Agar Brucella Suplementado	74

<b>Figura 18.</b> Unión de células bacilares y cocoides de <i>H. pylori</i> NCTC 11637 con las perlas inmunomagnéticas	74
<b>Figura 19.</b> Pruebas bioquímicas de ureasa (A), catalasa (B) y oxidasa (C) para confirmación presuntiva de <i>H. pylori</i> por cultivo en muestras de agua	75
<b>Figura 20.</b> Crecimiento microbiano en agar Brucella suplementado en cultivo mixto con presencia de colonias presuntivas de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda	76
<b>Figura 21.</b> Estandarización de las temperaturas de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR de los genes en estudio de <i>H. pylori</i>	79
<b>Figura 22.</b> Muestras de agua cruda positivas para <i>H. pylori</i> por las estrategias de cultivo evaluadas en las plantas de tratamiento	80
<b>Figura 23.</b> Identificación por FISH de <i>H. pylori</i> en la muestra de agua cruda N° 17 de la PTAP 2, siembra directa a partir de la suspensión después de la centrifugación	81
<b>Figura 24.</b> Crecimiento bacteriano en agar Brucella suplementado a partir de muestras de agua potable por filtración por membrana tras enriquecimiento	89
<b>Figura 25.</b> Muestras de agua potable positivas para <i>H. pylori</i> por las estrategias de cultivo evaluadas en las plantas de tratamiento	91
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de la presencia e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo en aguas crudas y potables en las tres plantas de potabilización	99
<b>Figura 27.</b> Tm de muestras de agua cruda y potables positivas para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	107
<b>Figura 28.</b> Curvas de amplificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de agua	107
<b>Figura 29.</b> Electroforesis que muestra el fragmento específico del gen <i>vacA</i> amplificado de <i>H. pylori</i> en muestras de agua cruda y potable	109
<b>Figura 30.</b> Resultados de la detección de <i>H. pylori</i> en agua cruda y potable en las tres plantas de tratamiento por las tres técnicas evaluadas	109
<b>Figura 31.</b> Resultados de la detección de <i>H. pylori</i> en agua cruda y potable por las técnicas evaluadas en la PTAP 1	110
<b>Figura 32.</b> Resultados de la detección de <i>H. pylori</i> en agua cruda y potable por las técnicas evaluadas en la PTAP 2	110

<b>Figura 33.</b> Resultados de la detección de <i>H. pylori</i> en agua cruda y potable por las técnicas evaluadas en la PTAP 3	111
<b>Figura 34.</b> Cuantificación de coliformes totales y <i>E. coli</i> a partir de agua cruda (PTAP 1) en agar Chromocult Coliformes	112
<b>Figura 35.</b> Cuantificación de esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor a partir de agua cruda (PTAP 2) en agar SPS	112
<b>Figura 36.</b> Concentración promedio de coliformes totales, <i>E. coli</i> y esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor en agua cruda de las plantas de potabilización	114

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO I.</b> Medios de Cultivo	172
<b>ANEXO II.</b> Reactivos y soluciones	177
<b>ANEXO II.1.</b> Aislamiento y concentración	177
<b>ANEXO II.2.</b> Soluciones y reactivos para FISH	178
<b>ANEXO II.3.</b> Reactivos y soluciones para PCR y qPCR	182
<b>ANEXO III.</b> Detección de <i>H. pylori</i> mediante cultivo, FISH, PCR y qPCR en muestras de agua cruda y potable	185
<b>ANEXO IV.</b> Resultados de los análisis de los indicadores de contaminación fecal en las muestras de agua potable y cruda de las plantas de tratamiento	194
<b>ANEXO V.</b> Resultados análisis fisicoquímicos de las muestras de agua potable y cruda de las plantas de tratamiento	203
<b>ANEXO VI.</b> Secuencias FASTA del gen <i>vacA</i> de las muestras y cultivos positivos de <i>H. pylori</i>	212
<b>ANEXO VII.</b> Publicaciones	241
<b>ANEXO VIII.</b> Formato de Cadena de Custodia - DM-LIAL-F024	243

## INDICE DE ABREVIATURAS

ABS: Agar Brucella Suplementado

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosomal

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

Cl<sub>2</sub> Libre: cloro libre residual

cm: centímetro

Ct: Punto de corte (Cycle threshold)

C. totales: Coliformes totales

dNTP: Deoxinucleótido trifosfato

DS: desviación estándar

*E. coli: Escherichia coli*

EDTA: Ácido entilendiaminotetracético

EPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección del Medio Ambiente)

FISH: Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes

fg: fentogramo

g: Gramos

*H. pylori: Helicobacter pylori*

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)

ID: Porcentaje de Identidad

ISO: International Organization for Standard

L: Litro

LNA: Locked Nucleic Acid (Ácidos Nucleicos Cerrados)

M: Molar

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio

mg: Miligramos

mL: Mililitro

N: Número de muestras

NaCl: Cloruro de Sodio

NCTC: National Collection of Type Culture

ng: Nanogramo

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PBS: Phosphate Buffered saline – Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PTAP: Planta de Tratamiento de Agua Potable

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real cuantitativa

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SIM: Separación Inmunomagnética

SM: Standard Methods

TAE: Tris-acético-EDTA

TBE: Tris-borate-EDTA

TE: Tris- EDTA

Tm: Temperatura de fusión (melting temperature)

ufc: Unidades formadoras de colonia

UG: Unidades Genómicas

UNT: unidades nefelométricas de turbidez

VNC: Viable No Cultivable

μL: microlitro

μS: microSiemens

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica, produciendo una de las infecciones más frecuentes en la población, con una prevalencia global del 50%, que alcanza el 70-80% en Colombia. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia, viabilidad y virulencia de *H. pylori* en aguas crudas y potables de tres plantas potabilizadoras de la ciudad de Bogotá. Para ello, se evaluaron 310 muestras (155 de cada matriz) mediante las técnicas de cultivo, PCR convencional y FISH. También se evaluaron indicadores de contaminación fecal y parámetros fisicoquímicos.

Se demostró la presencia de células cultivables de *H. pylori* en 56 de las 310 muestras de las tres plantas de potabilización (11-24%). También se detectó ADN de *H. pylori* en las 3 plantas por PCR convencional y qPCR (15-27% de las muestras de agua cruda y 24-31% de agua potable). Por qPCR fue posible cuantificar *H. pylori* en 13 (8.4%) muestras de agua cruda y en 20 (12.9%) de agua potable. El genotipo de *H. pylori* más prevalente en el agua fue *vacA m1/s1*.

No se encontró relación entre los indicadores de contaminación fecal y la presencia de *H. pylori* en el agua cruda ni potable. Tampoco se encontró relación entre el pH, la conductividad, la turbidez y el cloro residual de las muestras y la presencia y/o ausencia de *H. pylori*.

Los resultados de este estudio demuestran que células viables de *H. pylori* están presentes tanto en el agua de entrada como en la de salida de las plantas potabilizadoras analizadas, pudiendo ser estas un vehículo de transmisión del patógeno. Sin embargo, para evaluar el riesgo real al que está expuesto el consumidor, deben realizarse otros estudios que evalúen el potencial infeccioso de estas células.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, agua potable, agua cruda, PCR, FISH, qPCR, indicadores de contaminación fecal.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a bacteria able to colonize the gastric mucosa, producing one of the most common infections in the population, with a global prevalence of 50% which reaches 70%-80% in Colombia. The objective of the present study was to determinate the presence, viability and virulence of *H. pylori* in raw and drinking waters of three water treatment plants in the city of Bogotá. For this purpose, 310 water samples (155 of each type of water) were evaluated by culture, conventional PCR and FISH techniques. Fecal indicators and physic-chemical parameters were also evaluated.

The presence of cultivable *H. pylori* cells was demonstrated in 56 out of the 310 samples coming from the three water treatment plants (11-24%). *H. pylori* DNA was also detected by conventional PCR and q PCR (15-27% of raw water and 24-31% of drinking water samples); by qPCR it was possible to quantify *H. pylori* in 13 (8.4%) samples of raw water and in 20 (12.9%) of drinking water. The *H. pylori vacA m1/s1* genotype was the most prevalent among the analyzed water samples.

Regarding the fecal indicators and the presence of *H. pylori*, no relation was found in either raw or drinking water. No association was found between pH, the conductivity, turbidity and residual chlorine of the samples and the presence and/or absence of *H. pylori*.

Results obtained in this research demonstrate that viable *H. pylori* cells are present both in raw and drinking water of the analyzed water treatment plants being those able to be vehicle of transmission of the pathogen. However, in order to assess the real risk to which the consumer is exposed, other studies should be carried out to evaluate the potential infectious of these cells.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, raw water, drinking water, PCR, FISH, qPCR, fecal indicators.

## RESUM

*Helicobacter pylori* es una bactèria capaç de colonitzar la mucosa gàstrica, produint una de les infeccions més freqüents en la població, amb una prevalença global del 50%, i del 70-80% a Colòmbia. L'objectiu d'este estudi va ser determinar la presència, viabilitat i virulència de *H. pylori* en aigües crues i potables de tres plantes potabilitzadores de la ciutat de Bogotà. Per a aquest propòsit, es van avaluar 310 mostres (155 de cada matriu) per mitjà de les tècniques de cultiu, PCR convencional i FISH. També es van avaluar indicadors de contaminació fecal i paràmetres fisicoquímics.

Es va demostrar la presència de cèl·lules cultivables de *H. pylori* en 56 de les 310 mostres de les tres plantes potabilitzadores (11-24%). També es va detectar ADN de *H. pylori* a les 3 plantes per PCR convencioanl i qPCR (15-27% de les mostres d'aigua crua i 24-31% d'aigua potable). Per qPCR va ser possible quantificar *H. pylori* en 13 (8.4%) mostres d'aigua crua i en 20 (12.9%) d'aigua potable. El genotip de *H. pylori* més prevalent en l'aigua va ser el *vacA m1/s1*.

No es va trobar relació entre els indicadors de contaminació fecal i la presència de *H. pylori* ni a l'aigua crua ni a la potable. Tampoc es va trobar relació entre el pH, la conductivitat, la terbolesa i el clor residual de les mostres i la presència i/o absència de *H. pylori*.

Els resultats d'aquest estudi demostren que hi ha cèl·lules viables de *H. pylori* tant en l'aigua d'entrada com en la d'eixida de les plantes potabilitzadores analitzades, i podent ser aquestes un vehicle de transmissió del patogen. Malgrat això, per a avaluar el risc real a que s'exposa el consumidor, han de realitzar-se altres estudis que avaluen el potencial infecció d'aquestes cèl·lules.

**Paraules clau:** *Helicobacter pylori*, aigua potable, aigua crua, PCR, FISH, qPCR, indicadors de contaminació fecal.

# **1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El agua para consumo humano debe cumplir con parámetros microbiológicos y físico-químicos para que pueda ser considerada potable. En Colombia, de acuerdo con la resolución 2115 de 2007, el agua para consumo humano no debe contener microorganismos de origen fecal como coliformes totales, *Escherichia coli* (*E. coli*), heterótrofos, (oo) quistes de *Cryptosporidium sp.*, y *Giardia sp.* (Ministerio de Protección Social, 2007). Sin embargo, estudios recientes (Rodrigues y Cunh, 2017; Santiago *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012) demuestran que la determinación de *E. coli* no es suficiente para demostrar la ausencia de patógenos en el agua. Es por ello que la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency - USEPA) incluyó desde 2015 un nuevo listado de microorganismos patógenos, que pueden resistir los procesos de tratamiento convencional y ser transmitidos a través del agua a los humanos. Uno de estos microorganismos es *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) una bacteria patógena, capaz de colonizar la mucosa gástrica humana produciendo una de las infecciones más frecuentes en la población mundial con una prevalencia del 50% a nivel global y 77 - 80% en Colombia. La infección por esta bacteria se ha asociado con el desarrollo de gastritis crónica, úlceras pépticas, gastritis atrófica, linfoma gástrico intestinal tipo MALT y adenocarcinoma gástrico; motivo por el cual *H. pylori* fue incluido en 1994 por la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer - OMS (IARC, por sus siglas en inglés) como un carcinógeno tipo I.

El mecanismo exacto de transmisión de *H. pylori* se desconoce. Como se mencionó anteriormente, la bacteria coloniza e infecta la mucosa gástrica. Cuando las células de la mucosa gástrica se desprenden arrastran la bacteria al intestino para ser eliminada en las heces; a su vez, estas llegan a diferentes matrices ambientales, entre ellas el agua utilizada para riego agrícola y para potabilizar, sugiriendo a ésta como un vehículo probable de transmisión de la bacteria a los humanos. A pesar de ello, existen diversos factores que hacen difícil de determinar hasta qué punto influye el agua en la transmisión de *H. pylori*, ya que la morfología de la bacteria en ambientes diferentes al estomacal cambia cuando se enfrenta a condiciones adversas, como puede ser el contacto con antibióticos, cambios de tensiones de oxígeno, temperatura etc. Bajo alguna de estas condiciones adversas la bacteria pasa de su forma convencional en la mucosa gástrica “forma espiral” a una forma cocoide.

La forma cocoide tiene varias etapas de diferenciación en las que su viabilidad y actividad metabólicas cambian. Las formas cocoides tempranas, que incluso pueden ser recuperadas por métodos de cultivo, cambian a formas cocoides viables, en donde la bacteria posee aún capacidad de colonizar e infectar la mucosa gástrica cuando es ingerida, hasta llegar a las formas cocoides picnóticas, que se reconocen como el estadio final de viabilidad en el que ésta ha entrado en una fase de muerte.

Dadas estas variaciones morfológicas y de viabilidad es un reto demostrar su presencia en el agua y más aún demostrar su capacidad infectante. Son diversas las estrategias metodológicas que hasta el momento se han utilizado para ello; una de ellas es el cultivo en medios selectivos, que arroja resultados diferentes dependiendo de la concentración de la bacteria presente en el agua, la presencia de otros microorganismos acompañantes, la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento, y el estado morfológico y de viabilidad de la bacteria. En el caso de las aguas potables la concentración de la bacteria puede ser muy baja, por lo que se debe recurrir a diferentes estrategias para concentrarla, tales como filtración, centrifugación y siembra directa. En el caso de las aguas crudas se han utilizado estrategias de filtración, centrifugación y separación inmunomagnética. Esta última separa *H. pylori* de las otras bacterias presentes en la muestra gracias al uso de anticuerpos específicos. De igual forma, se han usado técnicas de inmunofluorescencia y de detección de ácidos nucleicos como: hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa a Tiempo Real (qPCR) para la detección de *H. pylori* a partir de muestras de agua. A pesar del éxito obtenido con algunos de estos métodos, hasta el presente no existe un procedimiento estándar para la detección de *H. pylori* en el agua.

Teniendo en cuenta los siguientes antecedentes:

1. En la ciudad de Bogotá la prevalencia de la infección por *H. pylori* es alta (80 – 90%).
2. Bogotá cuenta con tres plantas de tratamiento de agua potable que reciben aguas que previamente han sido contaminadas con materia fecal, las cuales son tratadas

y convertidas en agua potable para suministro de la población, cumpliendo con la normatividad colombiana vigente. Sin embargo, existe la posibilidad que la bacteria *H. pylori* pueda ser transportada en el agua potable.

3. La normatividad colombiana estipula el uso de indicadores de contaminación fecal como *E. coli* y coliformes totales para determinar la calidad del agua de consumo humano.
4. Los estudios previos realizados por el grupo de investigación de enfermedades infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana confirman que, además de la alta prevalencia de la infección por *H. pylori*, más de 20% de los aislamientos obtenidos de pacientes con gastritis crónica en la ciudad son resistentes a claritromicina y levofloxacin, dos de los antimicrobianos utilizados en las terapias de erradicación.
5. El cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer en la ciudad.

Es importante conducir estudios que permitan comprender los posibles mecanismos de transmisión de la bacteria en la población. Como se mencionó previamente, se ha postulado al agua como un posible vehículo para la transmisión de *H. pylori*. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios previos realizados en la ciudad de Bogotá que determinen la presencia de la bacteria en aguas crudas y de consumo. De igual forma, tampoco se conoce cual es el estado de viabilidad del microorganismo en estas aguas. Por último, es relevante determinar si los indicadores tradicionales de control de calidad del agua (coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor) y los cambios que puedan presentarse en los parámetros físico-químicos usados por las plantas potabilizadoras para control diario (pH, conductividad, turbidez y cloro residual) pueden ser usados como indicativos de la presencia de *H. pylori* en el agua. Es por este motivo que en el presente estudio se planteó la siguiente pregunta: ¿Está *H. pylori* presente y viable en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización de la ciudad de Bogotá?

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### 2.1. Contaminación del agua por microorganismos patógenos

La integridad y la buena gestión de los sistemas de distribución es una de las barreras más importantes que protegen el agua de consumo de la contaminación. Sin embargo, la gestión de los sistemas de distribución a menudo recibe muy poca atención y con frecuencia éstos son vistos de forma incorrecta como sistemas pasivos, cuyo único requisito es el transporte de agua potable desde los puntos de salida de las plantas de tratamiento hasta a los consumidores (WHO, 2014 y 2004).

En países en vías de desarrollo el agua juega un papel importante en la transmisión de enfermedades causadas por microorganismos (Akcam *et al.*, 2000). La principal razón de esta situación es el alto costo que representa la puesta a punto de procesos de tratamiento y el mantenimiento de infraestructuras apropiadas que permitan el control sanitario (Langford, 2005).

Un daño general en el sistema de protección de la red de abastecimiento de agua de consumo puede ocasionar una contaminación a gran escala y, potencialmente, epidemias detectables. Otras averías que conduzcan a contaminaciones leves, posiblemente repetidas, pueden ocasionar brotes esporádicos significativos de enfermedades, pero no es probable que las autoridades de vigilancia de salud pública los asocien con el abastecimiento de agua de consumo. La evaluación y cuantificación de los riesgos puede ayudar a comprenderlos y gestionarlos, sobre todo los relacionados con casos esporádicos de enfermedad (WHO, 2014 y 2004).

La gama de agentes patógenos que pueden ser transmitidos por el agua de consumo contaminada varía enormemente en función de factores tales como el aumento de la población y animales, el incremento del uso de aguas residuales no tratadas, los cambios de los hábitos de la población, las migraciones y viajes de la población, y presiones selectivas que favorecen la aparición de agentes patógenos nuevos o mutantes, o la recombinación de los patógenos existentes. También existe una variabilidad importante en la inmunidad de las personas, ya sea adquirida por contacto con un agente patógeno o determinada por factores como la edad, el sexo, el estado de salud y las condiciones de vida (WHO, 2014).

El mayor riesgo microbiano del agua está relacionado con su contaminación a partir de heces humanas o animales, aunque puede haber otras fuentes y vías de exposición significativas. Para reducir la transmisión de enfermedades por la vía fecal-oral es importante mejorar la calidad del agua de consumo y su disponibilidad, así como los sistemas de eliminación de materia fecal y la higiene general (WHO, 2014; Ainsworth, 2004; Bartram *et al.*, 2003; FAO/WHO, 2003).

## 2.2. El agua como vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas

Los riesgos para la salud relacionados con el agua de consumo más comunes y frecuentes son las enfermedades ocasionadas por agentes patógenos transmitidos por vía fecal-oral, como bacterias (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* H7:O157), protozoos (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Helmintos*) y virus (enterovirus). También diversos patógenos de vida libre, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*, *Naegleria* y *Mycobacterium* spp, se vinculan a enfermedades relacionadas con el agua (Buse *et al.*, 2012; Dorevitch *et al.*, 2012; Wingender y Flemming, 2011).

El efecto en la salud pública depende de la infectividad del patógeno, la gravedad de la enfermedad y la población expuesta (WHO, 2014 y 2004). Los agentes patógenos y parásitos de mayor riesgo transmitidos por el agua son los que poseen una infectividad alta, pueden proliferar en el agua y/o poseen una resistencia alta fuera del organismo hospedador (Van Lieverloo *et al.*, 2007; Jungfer *et al.*, 2007).

Aunque los patógenos transmitidos por el agua son capaces de sobrevivir en el agua de consumo, la mayoría no crecen ni proliferan en ella. Tras abandonar su hospedador, la viabilidad y la capacidad infectiva de la mayoría de los agentes patógenos disminuye gradualmente de forma exponencial, y transcurrido cierto tiempo pierden su viabilidad hasta no detectar su presencia (WHO, 2014; An *et al.*, 2007; Ainsworth, 2004).

Diversos factores influyen en la persistencia de los microorganismos en el agua. Entre ellos, la temperatura juega un papel muy importante. El número de

microorganismos disminuye habitualmente con mayor rapidez a temperaturas superiores a los 20°C y la tasa de disminución puede verse potenciada por los efectos letales de la radiación UV de la luz solar que incide en la zona superficial del agua (Van Lieverloo *et al.*, 2007; Ainsworth, 2004).

Los virus y las formas latentes de los parásitos (quistes, ooquistes, huevos) no pueden multiplicarse en el agua. Por el contrario, la presencia de cantidades relativamente altas de carbono orgánico biodegradable, junto con temperaturas cálidas y concentraciones residuales bajas de cloro, pueden permitir la proliferación de microorganismos de *Legionella*, *Vibrio cholerae*, *Naegleria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acanthamoeba*, *Mycobacterium* spp y otros organismos contaminantes en aguas superficiales y en los sistemas de distribución de agua de consumo (Shakoor *et al.*, 2011; Thomas y Ashbolt, 2011; Wingender y Flemming, 2011; Buse *et al.*, 2012; Dorevitch *et al.*, 2012).

La calidad microbiológica del agua puede variar muy rápidamente y en gran medida por el vertido de aguas residuales domésticas, industriales, de extracción minera o de producción agrícola y ganadera, así como por actividades tales como el transporte terrestre, fluvial y marítimo de sustancias peligrosas o petróleo, y los residuos sólidos vertidos a directamente en las fuentes hídricas. Todos estos factores pueden producir aumentos repentinos en la concentración de agentes patógenos, aumentando el riesgo de enfermedades transmitidas por el agua. Los análisis de patógenos en el agua normalmente tardan demasiado, son costosos y requieren de laboratorios especializados en algunos casos, para que sus resultados puedan ser tenidos en cuenta por los responsables de la adopción de medidas para evitar el suministro de agua insalubre (WHO, 2014; Buse *et al.*, 2012; Dorevitch *et al.*, 2012).

La evaluación de la calidad microbiológica del agua debe incluir el análisis de bacterias, virus y parásitos. Dada la imposibilidad de aislamiento de cada uno de los agentes patógenos existentes en el agua, que por efecto de dilución se encuentran en baja cantidad (WHO, 2014; Gray, 1996), se ha optado por el uso de indicadores de contaminación, que se definen como grupos de microorganismos no patógenos, pero frecuentemente asociados con los mismos (Ribas *et al.*, 2000). Históricamente

los microorganismos indicadores de contaminación fecal se han elegido de acuerdo a determinados criterios; algunos de ellos son: deben estar universalmente presente en gran número en las heces de los seres humanos y animales de sangre caliente, deben ser fáciles de detectar por métodos sencillos y no deben desarrollarse en el agua en condiciones naturales. Además, es indispensable que su persistencia en el agua y grado en que se eliminan durante el tratamiento de ésta sean similares a los de los patógenos (WHO, 2014; Gray, 1996). Los indicadores más usados son: enterobacterias fermentadoras de la lactosa (coliformes totales), coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* y esporas de anaerobios sulfito-reductores. La Organización Mundial de la Salud, en su guía para la Calidad del Agua Potable, reconoce a *E. coli* como el indicador de elección para el caso de las bacterias (WHO, 2014).

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo asociado a *Clostridium spp.* y, como tal, se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbios, formadores de esporas, que están normalmente en las heces aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Clostridium perfringens* que, de acuerdo a un estudio realizado en los sistemas hidrológicos de Estados Unidos, fue detectado en un 73% de las muestras, demostrando así su presencia en las aguas naturales, al igual que los coliformes (WHO, 2014; Franczy *et al.*, 2000). El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden proceder de otras fuentes ambientales como suelo, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, heridas infectadas de humanos y animales o aguas superficiales (WHO, 2014; Hijnen *et al.*, 2000).

Los anaerobios sulfito-reductores se han propuesto como indicadores de alto riesgo de contaminación del agua, ya que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliformes y son resistentes a la desinfección, al punto que pueden ser detectados en algunas muestras de agua después de haber recibido pre-desinfección, floculación, sedimentación, filtración y desinfección terminal (Payment y Franco, 1993). Por ello, la presencia de anaerobios sulfito-reductores se relaciona con el riesgo de supervivencia de agentes patógenos en ciertos ecosistemas expuestos a contaminación fecal remota, así como con el

riesgo de la presencia de microorganismos capaces de resistir a los tratamientos habitualmente aplicados al agua para su potabilización (WHO, 2014; Lisle *et al.*, 2004; Gesche *et al.*, 2003).

Los microorganismos pueden llegar por diferentes vías a las redes de distribución de agua de consumo, adherirse y crecer en las tuberías de agua potable y otras superficies, formando biopelículas, sobre todo en los puntos más lejanos de los sistemas de distribución, donde los flujos y la concentración de cloro residual pueden ser bajos. Las biopelículas presentan áreas de sorción (retención de sustancias) que pueden unir y acumular contaminantes orgánicos e inorgánicos, así como partículas y material coloidal. Las sustancias poliméricas extracelulares producidas por los microorganismos presentes en la biopelículas actúan como agentes de protección frente al estrés biológico, físico, químico y ambiental, incluyendo la depredación, la desecación, cambios de flujo y la acción de desinfectantes (Wingender y Flemming, 2011; USEPA, 2006).

La formación de la biopelícula causa un deterioro en la calidad organoléptica y microbiológica del agua, y actúa como barrera protectora de las bacterias patógenas que hayan sobrevivido a los procesos de potabilización. Por ejemplo, *H. pylori*, los virus y quistes u ooquistes de protozoos, necesitan un hospedador de sangre caliente, y por tanto su supervivencia en el agua es limitada. Sin embargo, su incorporación en las biopelículas podría prolongar su supervivencia (Wingender y Flemming, 2011; DVGW, 2011).

La gran mayoría de los organismos de las biopelículas no son patógenos, pero pueden incluir patógenos oportunistas y de vida libre. Además, aunque la mayoría de bacterias heterótrofas de vida libre, hongos, protozoos, nematodos y crustáceos presentes en las biopelículas probablemente no sean de riesgo para los consumidores de agua potable, sus actividades pueden producir problemas de sabor y olor, aumentar la demanda de desinfectante y contribuir a la corrosión (OMS 2011, NRC 2006). Los microorganismos que crecen en las biopelículas posteriormente pueden desprenderse de las paredes de la tubería en el agua por diversas

circunstancias, tales como los cambios en el caudal, y representan una fuente potencial de contaminación del agua (Wingender y Flemming, 2011).

Las biopelículas se pueden desarrollar dentro de las tuberías y en otros componentes, tales como puntos de salida, válvulas mezcladoras y arandelas. Las biopelículas son difíciles de eliminar de todas las partes del sistema una vez que se han establecido, y pueden ser resistentes a los desinfectantes. Por lo tanto, el objetivo no es eliminar las biopelículas totalmente de los sistemas de distribución, sino controlar su crecimiento (DVGW, 2011; Wingender y Flemming, 2011; Giõa *et al.*, 2010).

### **2.3. *Helicobacter pylori*, patógeno acuático emergente**

#### **2.3.1. Antecedentes históricos y situación taxonómica actual**

A finales del siglo XIX se realizaron las primeras descripciones de microorganismos espirales en el estómago de animales. Durante una ponencia en 1881, Rappin mencionó que había observado una bacteria espiral en el estómago canino, a la que denominó *Spirocheta rappini*. En 1893, Bizzozero publicó varios dibujos de organismos espirales en el estómago de perros, que hoy conocemos como *Helicobacter heilmannii*. Tres años después, Salomon presentó un informe bacteriológico de organismos espirales, probablemente *Helicobacter felis*, en el estómago de perros y gatos, incluyendo su estructura flagelar, motilidad y manejo en el laboratorio (Blum, 1997).

Marshall y Warren, en 1982 lograron el primer cultivo de *Campylobacter pyloridis*, el actual *Helicobacter pylori* (Warren y Marshall, 1983), hecho que revolucionó la ciencia de la gastroenterología, y por el que se les concedió el Premio Nobel de Medicina en octubre de 2005. *H. pylori* está hoy en día considerado como el agente infeccioso más extendido en humanos, se distribuye a lo largo de todo el mundo y se estima que alrededor de la mitad de la población humana está infectada con este patógeno.

El camino hasta su clasificación taxonómica actual ha sido largo. En 1989, análisis del rRNA y estudios ultraestructurales dieron como resultado el establecimiento del género *Helicobacter*, transfiriéndose las especies *Campylobacter pylori* (anteriormente *Campylobacter pyloridis*) y *Campylobacter mustelae* (anteriormente *Campylobacter pylori* subesp. *mustelae*) al mismo (Goodwin *et al.*, 1989). Las claves para adscribir microorganismos al género fueron: bacterias curvadas Gram negativas, móviles mediante un flagelo envainado, capaces de formar estructuras cocoides, microaerófilas, quimiorganótrofas, incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos, con crecimiento óptimo a 37 °C e incapaces de crecer a 25 °C (Percival *et al.*, 2004).

Según la clasificación descrita en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology on line, (Euzéby, 2016) el género *Helicobacter*, junto con *Sulfurimonas*, *Thiovulum* y *Wolinella*, se agrupan formando la familia *Helicobacteraceae* (Vandamme, 2000), que junto a la familia *Campylobacteraceae*, *Nautillaceae* e *Hydrogenimonaceae* conforman el orden Campylobacterales de las  $\epsilon$ -Proteobacterias (Trust *et al.*, 1994).

Dentro del género *Helicobacter*, las especies pueden clasificarse en dos grupos en función de su reservorio, el estómago o el intestino. Existen algunas especies como *H. aurati*, *H. bilis* y *H. muridarum*, que pueden ser aisladas tanto del estómago como del intestino.

Las Tablas 1 y 2 muestran las distintas especies del género, según el reservorio donde se encuentran y los hospedadores de los que se han aislado.

**Tabla 1.** Especies intestinales del género *Helicobacter*

Nombre	Hospedero	Referencia
<i>H. apri</i>	Jabalís	Zanoni <i>et al.</i> (2016)
<i>H. aurati</i>	Hamsters	Patterson <i>et al.</i> (2002)
<i>H. bilis</i>	Ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1997)
<i>H. canadensis</i>	Hombre	Fox <i>et al.</i> (2002)
<i>H. canis</i>	Perros, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1994)
<i>H. cholecystus</i>	Hamsters	Franklin <i>et al.</i> (1997)

<b><i>H. cinaedi</i></b>	Hombre, hamsters y macacos	Totten <i>et al.</i> (1988); Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<b><i>H. equorum</i></b>	Caballos	Moyareert <i>et al.</i> (2007)
<b><i>H. fennelliae</i></b>	Hombre	Totten <i>et al.</i> (1988); Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<b><i>H. ganmani</i></b>	Ratones, perros y hombre	Robertson <i>et al.</i> (2001)
<b><i>H. hepaticus</i></b>	Ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1994)
<b><i>H. macacae</i></b>	Monos	Fox <i>et al.</i> (2013)
<b><i>H. marmotae</i></b>	Marmotas	Fox <i>et al.</i> (2006)
<b><i>H. mesocricetorum</i></b>	Hamsters	Simmons <i>et al.</i> (2000)
<b><i>H. muridarum</i></b>	Ratones, ratas	Lee <i>et al.</i> (1992)
<b><i>H. pametensis</i></b>	Aves, cerdos	Dewhirst <i>et al.</i> (1994)
<b><i>H. pullorum</i></b>	Pollos, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1995)
<b><i>H. rodentium</i></b>	Ratones	Shen <i>et al.</i> (1997)
<b><i>H. trogontum</i></b>	Ratas	Mendes <i>et al.</i> (1996)
<b><i>H. typhlonius</i></b>	Ratones	Franklin <i>et al.</i> (2002)
<b><i>H. valdiviensis</i></b>	Pájaros	Collado <i>et al.</i> (2014)

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)).

**Tabla 2.** Especies gástricas del género *Helicobacter*

<b>Nombre</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>H. acinonychis</i></b>	Guepardos	Eaton <i>et al.</i> (1993)
<b><i>H. baculiformis</i></b>	Gatos	Baele <i>et al.</i> (2008)
<b><i>H. bizzozeronii</i></b>	Perros	Hänninen <i>et al.</i> (1996)
<b><i>H. cynogastricus</i></b>	Perros	Van de Bulck <i>et al.</i> (2006)
<b><i>H. felis</i></b>	Gatos, perros	Paster <i>et al.</i> (1991)
<b><i>H. heilmannii</i></b>	Gatos, hombre	Smet <i>et al.</i> (2012)
<b><i>H. himalayensis</i></b>	Marmotas	Hu <i>et al.</i> (2015)
<b><i>H. mustelae</i></b>	Hurones	Fox <i>et al.</i> (1988); Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<b><i>H. nemestriae</i></b>	Macacos	Bronsdon <i>et al.</i> (1991)

<i>H. pylori</i>	Hombre, macacos	Marshall <i>et al.</i> (1985); Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. salomonis</i>	Perros	Jalava <i>et al.</i> (1997)
<i>H. suis</i>	Cerdos	Baele <i>et al.</i> (2008)

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)).

Las especies descritas en las Tablas 1 y 2 son las validadas para el género *Helicobacter*. Actualmente existen otras especies que no cumplen los criterios para ser consideradas como especies, en muchos de los casos debido a la imposibilidad de obtener su cultivo, por lo que pasan a ser *Candidatus*. La categoría *Candidatus* se propuso para designar provisionalmente especies de procariontes de descripción incompleta (Murray y Stackebrandt, 1995). Actualmente encontramos como especies *Candidatus* del género *Helicobacter* a *H. mastomyrimus* (Shen *et al.*, 2005), *H. brantae* (Fox *et al.*, 2006), *H. anseris* (Fox *et al.*, 2006) y *H. centorum* (Harper *et al.*, 2006).

### 2.3.2. Morfología y características fisiológicas del género *Helicobacter*

El género *Helicobacter* agrupa 31 especies caracterizadas por ser bacilos Gram-negativos, helicoidales, espirales o rectos, de 0.3-1.0 µm de ancho y de 1.5-5 µm de largo. Presenta extremos redondeados y cuando son curvados muestran periodicidad espiral (Vandamme *et al.*, 1991). Pueden tener un único flagelo polar (*H. cinaedi* y *H. fenneillae*) o múltiples flagelos laterales, unipolares o bipolares (*H. pylori*), con una protuberancia terminal, de 30 µm de longitud y 2.5 nm de grosor. Todos los flagelos son envainados. Se ha sugerido que la vaina del flagelo es una adaptación para moverse a través de la mucosa y protegerse contra el ácido del estómago (Owen, 1993).

Son bacterias microaerófilas, con metabolismo de tipo respiratorio. No utilizan carbohidratos. El crecimiento en los medios de cultivo diseñados para recuperar bacterias del género *Helicobacter* se evidencian tras 2-5 días de incubación a 37 °C, las características de las colonias son no pigmentadas, translúcidas, de 1-2

mm de diámetro. Crecen a 30 °C pero no a 25 °C. Son catalasa y oxidasa positivo. Producen H<sub>2</sub>S y no son capaces de hidrolizar el hipurato. Las especies gástricas son productoras de ureasa. Su contenido en G+C varía entre 35 y 44% (Vandamme *et al.*, 1991).

### 2.3.2.1. Características de *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es la especie tipo del género y la más importante en patología humana por su estrecha relación con la úlcera péptica y el cáncer gástrico (Dunn *et al.*, 1997). Es una bacteria Gram-negativa, mide de 2 a 4 µm de longitud y 0,5 a 1 µm de ancho, microaerófilo, posee una membrana externa y, en promedio, seis flagelos polares que están protegidos por una estructura lipídica; es ureasa, catalasa y citocromo-oxidasa positivo. Entre sus principales factores de virulencia se encuentra la ureasa, que transforma la urea en amoníaco y agua, permitiendo a la bacteria sobrevivir en el estómago en pH ácido mediante la creación de un entorno neutro; también se encuentran lipasas, adhesinas, factor activador plaquetario y las citotoxinas CagA y VacA entre otros (Terebiznik *et al.*, 2006; Marshall, 2002; Brown, 2000).

Aunque por lo general su forma es espiral, la bacteria puede aparecer como un bacilo o en forma cocoide, después de prolongados tiempos de cultivo *in vitro*, un largo período de inoculación en muestras de agua o leche, o el tratamiento con antibióticos (Percival y Suleman, 2014; Vale y Vitor, 2010; She *et al.*, 2003). *H. pylori* presenta dos formas, la forma espiral que es viable y cultivable y una forma cocoide que es viable pero no cultivable (VCN) (Percival y Suleman, 2014; Lofgren *et al.*, 2011). Diversos estudios han demostrado que la cantidad de ADN, ARN y el contenido de ATP se reducen en las formas cocoides y también expresan menos proteínas relacionadas con la superficie celular (Engstrand, 2001; Wang *et al.*, 1997). Como resultado de la transformación de la bacteria en la forma cocoide ocurre la condensación del ADN y RNA bacteriano, pero no se evidencian cambios fundamentales en la expresión de los genes de virulencia de *H. pylori* (Wang *et al.*, 2004). Saito *et al.* (2003) revelaron que las formas cocoides de *H. pylori* no son células

pasivas ya que podían infectar activamente las células epiteliales gástricas de los humanos, lo que demuestra que estas células no cultivables son formas infectivas.

Actualmente se admite que existen tres estados de la forma cocoide de *H. pylori*: 1) una degenerativa, picnótica, no cultivable donde la bacteria se encuentra en fase de muerte; 2) una forma cocoide que es viable pero no cultivable (VNC) y 3) una forma cocoide viable que puede ser cultivada en agar, debido a la capacidad de la bacteria de retornar a su forma vegetativa helicoidal, lo cual abre nuevos horizontes para entender la transmisión de la infección de *H. pylori* a través del agua (Dús *et al.*, 2013; Andersen y Rasmussen, 2009; Azevedo *et al.*, 2007).

Kusters *et al.* (1997) realizaron un estudio para determinar si la conversión morfológica de *H. pylori* es un proceso activo que requiere la síntesis *de novo* de proteínas, mediante la comparación de las tasas de conversión en presencia y ausencia de la proteína y de los inhibidores de la síntesis de ARN, y encontraron que la conversión es un proceso pasivo y que la síntesis activa de proteínas y de ARN no es necesaria para la conversión de *H. pylori* a partir de su forma helicoidal a cocoide. También estudiaron los efectos de diferentes condiciones de incubación en la tasa de conversión morfológica de *H. pylori*, con el fin de establecer en qué medida las condiciones de incubación adversas estimulan la conversión a formas cocoides, encontrando que el primer signo ultraestructural de la conversión morfológica es la formación de una estructura en forma de ampolla, en un extremo de la bacteria. Esta ampolla luego aumenta de tamaño y se traslada a la parte media, aumentando de esta forma la curvatura de la bacteria. La estructura en forma de ampolla continúa creciendo en tamaño, y con ello la morfología de la bacteria cambia de forma bacilar, a forma de U, y posteriormente a una forma totalmente cocoide, donde ya no hay un claro cilindro protoplásmico; finalmente, la bacteria pierde la integridad de la membrana (Kusters *et al.*, 1997).

La forma de supervivencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos es poco conocida. Tampoco se conoce cómo el entorno afecta su viabilidad. Por esta razón se ha sugerido que la presencia de formas cocoides en aguas potables y crudas

utilizadas por los humanos puede influir en la transmisión de la infección (Li *et al.*, 2014; Plonka *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2007; Cellini *et al.*, 2004).

### 2.3.2.2. Factores de patogenicidad de *H. pylori*

Varios genes de *H. pylori* se han asociado con virulencia y mayor riesgo de enfermedad gástrica grave. En particular se han estudiado genes relacionados con la producción de citotoxinas bacterianas, la inducción de citoxinas proinflamatorias y la adhesión de la bacteria al epitelio (Atherton, 1998). Los determinantes patogénicos de *H. pylori* se han dividido en dos grupos: factores de virulencia, como *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *oipA* entre otros, que contribuyen a los efectos patogénicos de la bacteria; y factores que permiten a la bacteria colonizar y mantenerse en el hospedador, como *glmM* y *ureA*.

El gen *glmM* codifica para la enzima fosfoglucosamina mutasa (De Reuse *et al.*, 1997), enzima que cataliza la interconversión de GlcN-6-fosfato, encargado de producir uno de los precursores del peptidoglucano de la pared celular bacteriana. Se ha demostrado que este gen desempeña un papel único y esencial para el crecimiento y supervivencia de *H. pylori* (De Reuse *et al.*, 1997), y ha sido propuesto para detección de *H. pylori* a partir de muestras clínicas y muestras con un alto contenido de microbiota acompañante e interferentes orgánicos (Bamford *et al.*, 1998). Quaglia *et al.* (2008), utilizaron el gen *glmM* de *H. pylori* para determinar su presencia en muestras de leche y lo detectaron en 34.7% (139/400) muestras.

*H. pylori* es capaz de sobrevivir contra los efectos nocivos del ácido gástrico produciendo ureasa, localizada en el citosol y la membrana bacteriana. Esta enzima hidroliza la urea generando amoníaco, con lo que su entorno inmediato se convierte en un medio relativamente alcalino a la vez que estimula la activación de la fagocitosis mononuclear y la secreción de citoquinas. Estudios *in vitro* han demostrado que la ureasa también tiene efecto toxico directo sobre las células epiteliales gástricas (Córdova-Espinoza *et al.*, 2011; Otteman y Lowenthal, 2002). Se han descrito diversas variantes de los genes que la codifican, aunque no parecen afectar la virulencia del patógeno (Moore *et al.*, 1993).

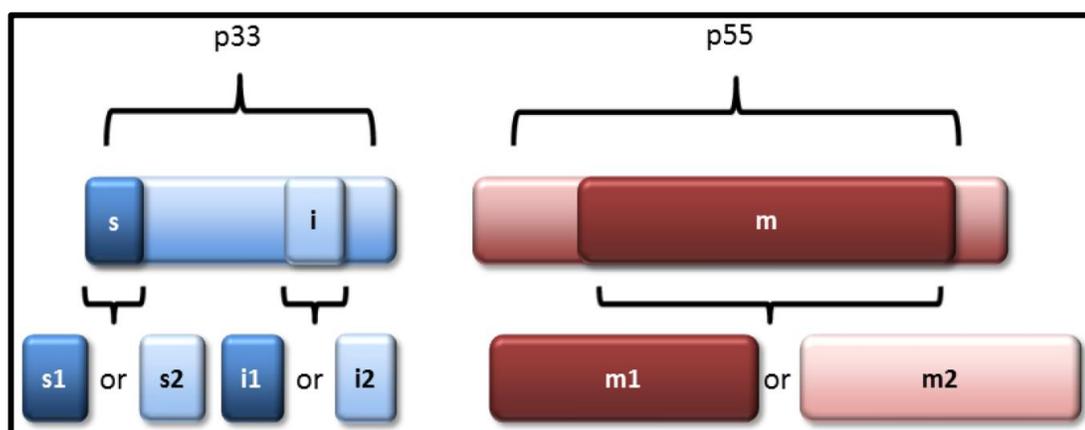
El gen *ureA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y ha sido ampliamente utilizado para la detección de la bacteria a partir de muestras ambientales (Cuervo *et al.*, 2017; Carbone *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2003a). La presencia de *H. pylori* en una región de Japón, con una alta tasa de infección, fue investigada por Sasaki *et al.* (1999) utilizando el gen *ureA*. Estos investigadores comprobaron que el ADN de *H. pylori* estaba presente en el agua de ríos y estanques, especímenes de moscas y heces de vaca, indicando que el agua y otras fuentes ambientales podrían servir como vehículos para la transmisión de *H. pylori*.

La proteína VacA es una de las principales toxinas de *H. pylori* y uno de los factores de virulencia que más se asocian a la incidencia de enfermedades gástricas severas, junto con CagA y BabA (Cover y Blanke, 2005). Al interactuar con las células epiteliales esta toxina induce la formación de vacuolas, alterando las funciones normales que ocurren en la vía endocítica, ya que facilita la liberación de hidrolasas al medio extracelular, lo que a su vez afecta la integridad del epitelio gástrico y la degradación de ligandos exógenos. VacA también tiene la capacidad de unirse a la membrana interna de las mitocondrias, afectando a la polarización de la misma, y promoviendo la liberación del citocromo c, lo que desencadena la cascada pro-apoptótica de la caspasa III. VacA está compuesta por 2 subunidades (p33 y p55) y es codificada por el gen polimórfico *vacA* presente en todas las cepas de *H. pylori* (McClain *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2011).

Existen varias variantes alélicas del gen *vacA*: La variabilidad del gen *vacA* entre cepas parece estar limitada fundamentalmente a las regiones señal (alelos *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2*) y la región media (alelos *m1* y *m2*), cada gen *vacA* contiene un alelo *s* y un alelo *m*, y la diversidad en la secuencia afecta a la actividad vacuolizante de la citotóxina (Martínez-Carrillo *et al.*, 2014). El análisis de la presencia de las distintas combinaciones genotípicas de estas regiones con la aparición de las diferentes enfermedades, ha revelado que el genotipo *s1m1* causa mayor daño celular que el *s1m2*, mientras que los genotipos *s2m2* y el, raramente encontrado, *s2m1* no resultan tóxicos (Hemmatinezhad *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado que en el 50-60% de pacientes con patología de gastritis crónica son *H. pylori* positivos y el genotipo más prevalente es el *vacAs1m1* (80-90%). De igual forma, se ha reportado

que alrededor del 60% de los pacientes con cáncer gástrico son *H. pylori* positivos y el genotipo más frecuente es *vacAs1m1/cagA+* (60%) (Martínez Carrillo *et al.*, 2014; Cavalcante *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se ha identificado un nuevo sitio polimórfico dentro del gen, designado como región intermedia (i), por la posición que ocupa entre las regiones s y m, de la cual se han descrito las variantes i1 e i2. Varios estudios han demostrado una asociación significativa entre el alelo i1 y el cáncer gástrico, y que solo este alelo del gen aparece como marcador independiente de esta enfermedad. La tipificación de la región i podría ser suficiente para la identificación de las formas patogénicas de VacA, debido a que la presencia de i1 se relaciona con mayor citotoxicidad y la de i2 con su ausencia, indicando así la capacidad reguladora y predictora de patogenicidad de la región intermedia. La característica más importante de esta región es que genera aumento en la capacidad de formación del canal iónico, tropismo celular y una mayor actividad vacuolizante. Cuando i1 se asocia con s1 y m1 se presentan formas muy severas de enfermedad causada por *H. pylori* (McClain *et al.*, 2017; Keilberg y Ottermann, 2016; Rhead *et al.*, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Presentación esquemática del gen *vacA* de *Helicobacter pylori*. la figura ilustra la relación de las regiones *vacA* en los dominios p33 y p55 (McClain *et al.*, 2017).

El gen *vacA* ha sido ampliamente utilizado para detectar *H. pylori* en muestras clínicas y ambientales. En un estudio realizado en Inglaterra por Watson *et al.* (2004) se evaluaron los sistemas de distribución de aguas tratadas, como posibles fuentes

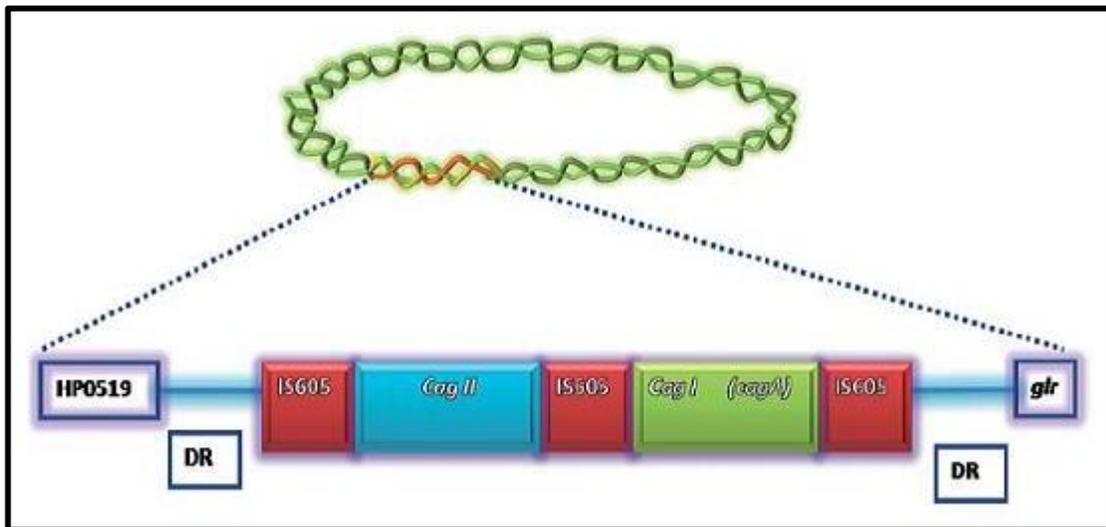
de transmisión de *H. pylori*, analizaron muestras de agua y biopelículas. Usaron PCR para amplificación de un fragmento del gen *vacA*, y detectaron ADN en 26% de las muestras, con una mayor frecuencia en las biopelículas (42%). Estos hallazgos evidencian que *H. pylori* se encuentra presente en el agua potable.

El gen asociado a la citotoxina CagA es un marcador de la presencia del islote de patogenicidad PAI, de 40 kb, el cual codifica para la proteína CagA y para los componentes de un sistema de secreción tipo IV, encargado de permitir la exportación de esta proteína al interior de la célula blanco (Figura 2). Las cepas de *H. pylori* pueden o no tener el gen, y por tanto se clasifican como *cagA* positivo y *cagA* negativo, siendo las primeras más virulentas que las segundas. Las cepas *cagA*+ se asocian con mayor inducción de interleukina 8 (IL-8) en el epitelio y mayor riesgo de producir úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer (Keilberg y Ottermann, 2016; Arévalo *et al.*, 2009).

Cittelly *et al.* (2002) realizaron un estudio utilizando cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes colombianos y encontraron que en gastritis no atrófica existe una frecuencia más baja de cepas con genotipos citotóxicos (*cagA* positivo y *vacA*) en comparación con la observada en gastritis atrófica, metaplasia intestinal, úlcera péptica y cáncer gástrico. Esto sugiere que estos genes pueden ser usados como marcadores de mayor virulencia y riesgo de desarrollar enfermedad gástrica severa; sin embargo, carecen de utilidad para diferenciar cepas con potencial carcinogénico de cepas con potencial ulcerogénico.

Se han propuesto otros genes como marcadores de virulencia, dentro de los cuales cabe destacar el gen *cagE*, que forma parte de *cagPAI*, como indicador de la funcionalidad de este complejo. Éste y otros genes del islote son importantes en el incremento de expresión de IL-8 en el epitelio gástrico (Ranjbar *et al.*, 2016).

El gen *oipA*, localizado fuera del PAI, puede inducir también liberación de IL-8 en la mucosa (Hemmatinezhad *et al.*, 2016; Quiroga *et al.*, 2005).



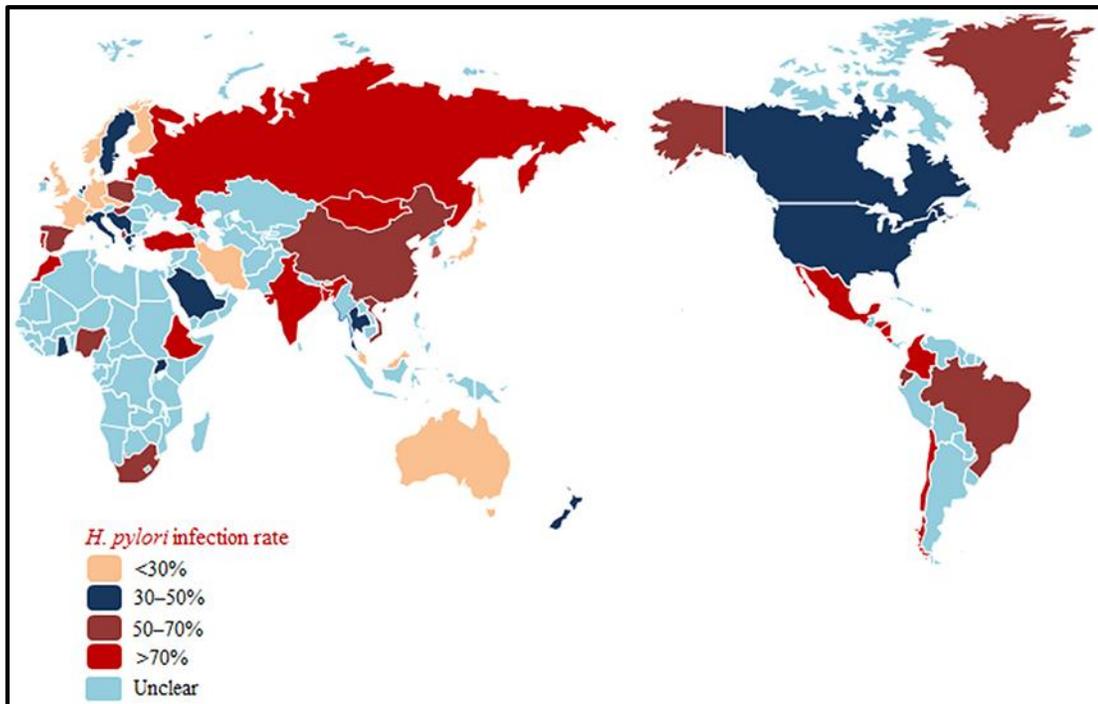
**Figura 2.** Representa la isla de patogenicidad de *H. pylori*. Región que se encuentra entre el gen *glr* y un ORF HP0519 (Arévalo *et al.*, 2009).

Uno de los retos en la investigación de la etiopatogenia de las enfermedades producidas por *H. pylori* es la identificación de los factores de virulencia predictivos de la progresión de la infección. Se han propuesto varios factores de virulencia como *cagA*, *vacA* y *babA*, entre otros. Aunque se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT, ninguno de ellos implica por sí mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto, ya que en el desarrollo de patologías gástricas están involucrados factores genéticos del huésped, ambientales y los factores de virulencia de la bacteria. Esta asociación aumenta cuantos más factores de virulencia acumula una bacteria (Wen *et al.*, 2009).

### 2.3.2.3. Transmisión de *H. pylori*

En la actualidad más del 50% de la población mundial está infectada por *H. pylori*. (Hu *et al.*, 2017; Keilberg y Ottemann, 2016). Se han destacado varios factores de riesgo relacionados con la infección por *H. pylori* y que son consecuencia de factores socioeconómicos; estos incluyen, pobre desarrollo social y económico, bajo nivel educativo, prácticas inadecuadas de higiene durante la infancia, hacinamiento familiar, carencia de baño en el hogar, ausencia de agua potable, ausencia de instalaciones para aguas residuales y el manejo inapropiado de alimentos (Vale y

Vitor, 2010; Nouraie *et al.*, 2009). El mejoramiento de las condiciones higiénicas generales disminuye la prevalencia de la infección. Factores genéticos del hospedador también se han asociado con la infección, especialmente en la progresión de la gastritis crónica a otras entidades como gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución de la infección de *H. pylori* en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico (Tomado de: Hu *et al.*, 2017).

A pesar la alta prevalencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial, las vías de transmisión son todavía inciertas (Mosane *et al.*, 2004). Son varias las teorías que se han propuesto para explicar la transmisión de la bacteria al humano, las más plausibles son la vía oral-oral y la vía fecal-oral (Keilberg y Ottemann, 2016; Brown, 2000).

La ruta exacta de la transmisión persona-persona todavía no es clara, aunque se ha demostrado que la bacteria es adquirida durante la infancia a través de la vía oral-

oral, de madre a hijo, o por contacto con familiares infectados (Keilberg y Ottemann, 2016).

Aunque el único reservorio conocido de *H. pylori* es el estómago humano, parece que este patógeno es capaz de sobrevivir en ambientes externos (Keilberg y Ottemann, 2016; Brown, 2000). La información exacta sobre su persistencia fuera del hospedador humano es limitada. A pesar de esto, cada vez existen más evidencias que *H. pylori* puede existir en reservorios externos y sirven de manera potencial para su transmisión al hospedador (Percival y Suleman, 2014; Moreno y Ferrús, 2012).

#### **2.3.2.4. El agua como una fuente de transmisión de la infección por *H. pylori***

La hipótesis que el agua puede ser una ruta de transmisión de *H. pylori* está soportada por aproximaciones epidemiológicas que han observado una alta prevalencia de la infección y una tasa de contaminación más rápida en países en desarrollo que, en la mayoría de los casos, sufren de problemas relacionados con la distribución de agua apta para el consumo humano entre la población (Aziz *et al.*, 2015; Hulten *et al.*, 1996.). Goodman *et al.* (1996), en un estudio realizado en Colombia, encontraron que el agua de los arroyos que los niños usan para bañarse, tomar y nadar, al igual que en las aguas de uso recreacional, aumentan significativamente el riesgo de infección de ésta población, presentando un OR= 3.3 (Plonka *et al.*, 2014; Palomino y Tomé, 2012; Goodman *et al.*, 1996).

Diversos estudios sugieren que *H. pylori* puede residir en los sistemas de agua potable, probablemente por la contaminación fecal de las aguas residuales sometidas o no a tratamiento y finalmente utilizadas como fuentes para potabilización del agua de consumo humano (Leja *et al.*, 2016; Bahrami *et al.*, 2013; Al-Sulami *et al.*, 2012). Se han realizado diversos estudios en los cuales se ha detectado *H. pylori* en agua potable. Entre estos destacamos el realizado por Mazari-Hiriart *et al.* (2005), quienes utilizaron la amplificación por PCR para la detección del gen *cagA* en muestras de agua tomadas antes y después del proceso de cloración. Los resultados obtenidos demostraron que el gen *cagA* se detectó en cuatro de siete muestras cloradas y en dos de ocho muestras no cloradas, mostrando que el proceso de desinfección del agua con cloro no representa una diferencia significativa en la presencia de *H. pylori*.

También realizaron la secuenciación del 16S rARN del ADN de *H. pylori* encontrado en las muestras de agua; los resultados de las secuencias obtenidas muestran una alta homología entre los genes 16S rARN de los aislamientos de *H. pylori* de humanos y de aguas.

Aunque la desinfección con cloro puede inactivar a *H. pylori*, y de este modo hacer difícil su detección en el agua de consumo, la bacteria puede residir en las biopelículas formadas por microorganismos heterótrofos que se encuentran en los sistemas de distribución de agua tratada y permanecer allí en su estado VNC (Khan *et al.*, 2012; Giañ *et al.*, 2010). Giañ *et al.* (2010) realizaron un estudio en el cual utilizaron una sonda de hibridación para el rARN 16S (PNA) y demostraron que *H. pylori* persiste en las biopelículas expuestas a bajas concentraciones de cloro (0.2 y 1.2 mg/L) hasta por 26 días, aunque en el estudio no pudo ser cultivado. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que el cloro en el agua podría inhibir la actividad de *H. pylori*, pero que no logra eliminar el patógeno en los sistemas de distribución de agua potable, en donde sobrevive en un estado VNC. Moreno *et al.* (2007) demostraron que *H. pylori* sobrevive a las prácticas de desinfección normalmente usadas en el tratamiento de agua potable, cuando ésta se encuentra en el estado VNC.

### 2.3.3. Estrategias de concentración de *H. pylori*

Una de las limitaciones para cultivar y aislar *H. pylori* a partir de agua potable es la baja concentración en la que se puede encontrar. Para concentrar *H. pylori* a partir de muestras de agua se han utilizado diversas estrategias que buscan obtener un mejor resultado en la recuperación y detección de la bacteria; las más usadas son: centrifugación, filtración y separación inmunomagnética.

#### 2.3.3.1. Centrifugación

El objetivo de la centrifugación es concentrar las células de *H. pylori* presentes en las muestras de agua. Esta ha sido una estrategia de concentración de la bacteria ampliamente utilizada tanto en aguas superficiales, como residuales, marinas y

potables. En los diversos estudios donde se aplica este método, el volumen de muestra utilizada varía entre 100mL y 1000mL. De igual forma, el tiempo y la velocidad de centrifugación varían entre 10 a 30 minutos y 1500 a 20000rpm, respectivamente. Una vez realizado el proceso de centrifugación el sobrenadante es descartado y el pellet es resuspendido. Esta suspensión es utilizada para la detección de la bacteria por diversos métodos de (Tirodimos *et al.*, 2014; Moreno y Ferrús, 2012; Nayak y Rose, 2007; McDaniels *et al.*, 2005).

### 2.3.3.2. Filtración

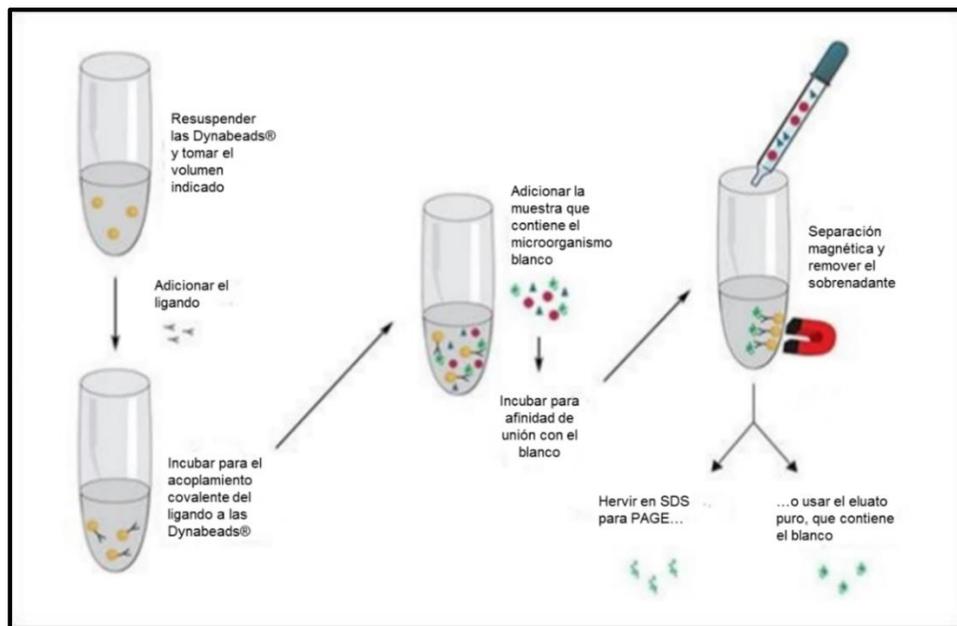
Para la concentración de *H. pylori* se ha utilizado frecuentemente el método de filtración por membrana, el cual consiste en hacer que la muestra de agua pase mediante vacío por un filtro de celulosa cuyo tamaño de poro puede variar entre 0,22  $\mu\text{m}$  y 0.8  $\mu\text{m}$ . De acuerdo al tamaño de *H. pylori*, las membranas más utilizadas son las de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y 0.45  $\mu\text{m}$ . En el caso del agua potable el volumen de muestra filtrado varía de 100 a 1000mL, debido a la baja concentración que se espera obtener de la bacteria en la muestra (Flores-Encarnación *et al.*, 2015; Herrera-Romero *et al.*, 2015; Bahrami *et al.*, 2013; Moreno y Ferrús, 2012; Moreno *et al.*, 2003a).

### 2.3.3.3. Separación Inmunomagnética (SIM)

La técnica de separación inmunomagnética (SIM) tiene grandes ventajas sobre los métodos de aislamiento tradicional de microorganismos patógenos en muestras heterogéneas, como sangre, alimentos y muestras fecales, siendo una técnica rápida y sensible para la separación de muchos patógenos (Fernández-Delgado *et al.*, 2008; Enroth y Engstrand, 1995; Olsvik *et al.*, 1994). La SIM utiliza partículas superparamagnéticas ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) que están cubiertas con una delgada envoltura de polímeros, encerrando el material magnético. Esto proporciona una superficie apropiada para la adsorción de varias moléculas de reactivos. Según la aplicación que se le quiera dar a la SIM existen distintos ligandos: anticuerpos, una proteína o antígeno, sondas de ADN o ARN o cualquier otra molécula con afinidad

para la muestra diana que se deseé aislar (Enroth y Engstrand, 1995; Olsvik *et al.*, 1994).

La metodología SIM consiste en el uso de perlas magnéticas sensibilizadas con anticuerpos específicos para antígenos de superficie de los microorganismos. El proceso de separación consta de dos pasos fundamentales: en el primero, la suspensión que contiene el microorganismo diana se mezcla con las perlas magnéticas sensibilizadas. De esta forma se produce la unión anticuerpo-antígeno (complejo magnético) alrededor de las perlas magnéticas y el microorganismo se adhieren a las perlas, formando agregados en un extremo del tubo gracias a la acción de un imán. En el segundo paso, el complejo magnético se lava varias veces para eliminar los contaminantes no deseados, incluyendo posibles inhibidores de la PCR que pudieran encontrarse en la muestra y se utiliza para detectar la presencia del microorganismo por cualquier método habitual (cultivo, PCR, hibridación, microscopía de fluorescencia, etc). La flexibilidad del sistema permite aislar prácticamente cualquier microorganismo diana, dependiendo del ligando específico empleado (Yakub y Stadterman-Knauer, 2004). (Figura 4).



**Figura 4.** Diagrama de la separación inmunomagnética (modificado de: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Este método de SIM seguido por un análisis por PCR, puede ser usado para la detección de *H. pylori* en aguas y materia fecal, ya que permite eliminar inhibidores de la PCR y por tanto una mejor detección de *H. pylori* en estas muestras, en las que la bacteria se encuentra posiblemente en forma cocoide (Velázquez y Feirtag, 1999; Enroth y Engstrand, 1995).

Enroth y Engstrand (1995) desarrollaron un protocolo basado en la asociación de las perlas inmunomagnéticas pre-tratadas con un anticuerpo monoclonal de adherencia a la superficie de *H. pylori*, para facilitar el aislamiento de la bacteria y como método de pre-tratamiento para la PCR. Esta técnica ha sido utilizada como un paso inicial importante para la concentración de *H. pylori* en aguas residuales no tratadas, ya que elimina las sustancias contaminantes que pueden interferir con el cultivo de la bacteria (Lu *et al.*, 2002).

La técnica de SIM-PCR fue usada para determinar la posible relación epidemiológica entre aislamientos de *Helicobacter* spp. a partir de aguas potables y la presencia de la bacteria en la comunidad (Hulten *et al.*, 1996). Aunque la obtención de falsos positivos por amplificaciones no específicas no se puede descartar, los resultados de este estudio fueron consistentes con las conclusiones del estudio epidemiológico previo.

#### **2.3.4. Técnicas para la detección e identificación de *H. pylori* en aguas**

##### **2.3.4.1. Detección y aislamiento por cultivo**

El método tradicional por excelencia para la detección e identificación de microorganismos es la observación de su crecimiento en sustancias nutritivas preparadas en el laboratorio. La capacidad de recuperación de bacterias a partir de una muestra viene determinada principalmente por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en ella y el estado fisiológico de las células presentes.

Para el aislamiento a partir de muestras altamente contaminadas, como es el caso de las muestras ambientales o de alimentos, es necesaria una primera fase de enriquecimiento, que consiste en incubar la muestra en un medio líquido selectivo, para eliminar parte de la microbiota acompañante, durante un periodo de 24-48 horas en las condiciones ambientales adecuadas, según el tipo de microorganismo. Se ha demostrado que las cepas de *H. pylori* crecen bajo condiciones de microaerofilia (Condiciones óptimas de 2-5% O<sub>2</sub>, 5-10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>). Su crecimiento puede darse entre 34-40°C, con un óptimo a 37°C durante 48-72 h. Aunque su ambiente natural es la mucosa gástrica, *H. pylori* sobrevive por cortos periodos de exposición a pH <4 pero su crecimiento ocurre en un rango relativamente amplio, de 5.5 a 8, con un crecimiento óptimo en pH neutro (Vale y Vitor, 2010; Kusters *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que *H. pylori* crece en medios de cultivo sólidos o líquidos muy enriquecidos y selectivos, entre los medios líquidos los más utilizados son Caldo Brucella (Walsh y Moran, 1997), caldo infusión cerebro corazón, caldo tripticasa de soya, caldo Mueller-Hinton (Walsh y Moran, 1997; Shahamat *et al.*, 1991), “caldo Andersen” (Andersen *et al.*, 1997), y Caldo Columbia (Shahamat *et al.*, 1991). Entre los medios de cultivo sólidos se destacan los agares BHI, Brucella, Columbia, DNase agar, Muller Hinton, Tripticasa de soya (TSA), agar Wilkins–Chalgren (Poms y Tatini, 2001; Stevenson *et al.*, 2000), Agar Base, Medio HPSPA (agar *H. pylori* peptona especial) (Degnan *et al.*, 2003) o Agar RA2 (Park *et al.*, 2001). Los medios se enriquecen al ser suplementados con sangre pura, suero, eritrocitos lisados, hemina (Shahamat *et al.*, 1991), extracto de levadura (Westblom *et al.*, 1999; Walsh y Moran, 1997), peptona (Walsh y Moran, 1997), IsoVitaleX (Henriksen *et al.*, 1995; Westblom *et al.*, 1991), Vitox (Morgan *et al.*, 1990), almidón (Coudron y Stratton, 1995), y ciclodextrinas (Walsh y Moran, 1997; Marchini *et al.*, 1994). Adicionalmente para hacer el medio selectivo se utiliza una combinación de antibióticos a los que de manera natural *H. pylori* es resistente, como por ejemplo el suplemento Dent, que contiene vancomicina, trimetoprim, cefsoludina y anfotericina B.

Duque-Jamaica *et al.* (2012) evaluaron varios medios de cultivo básicos: BHI, Brucella, y Mueller-Hinton y diversos suplementos a diferentes concentraciones: sangre de cordero, suero fetal bovino y sangre de caballo defibrinada, suplemento

antibiótico DENT, suplemento antibiótico Preston, IsoVitaleX y Vitox. De sus resultados se destaca que los medios y condiciones de cultivo óptimos fueron: Infusión Cerebro corazón, agar sangre (1,5% w/v), sangre de cordero (3,18% v/v), DENT (0,11% v/v), y Vitox (0,52% v/v) a 60 rpm y 37°C con CO<sub>2</sub> filtrado (5% v/v).

Para el cultivo de *H. pylori* en aguas se han desarrollado diversas estrategias, entre las cuales se destaca el uso de los siguientes medios de cultivo: Agar Columbia Sangre suplementado con 10% de sangre de caballo, Agar Brucella que contenía: 5% de sangre de oveja desfibrinada, 10 mg/l vancomicina, 5 mg/l trimetoprima, y 2500 IU/l sulfato de polimixina B, 7.5 mg/l de anfotericina B, y 5 mg/l cefsulodina o Agar RA2 (Moreno y Ferrús, 2012; Buck y Oliver, 2010; Gião *et al.*, 2008; Queralt y Araujo, 2007; Park *et al.*, 2001).

A pesar de la amplia investigación sobre medios de cultivo, pocos estudios han conseguido el aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de agua (Vale y Vitor, 2010). Lu *et al.* (2002) lograron aislar la bacteria a partir de aguas residuales municipales de un canal en la frontera entre Estados Unidos y México. Los autores utilizaron una combinación de la técnica de separación inmunomagnética (SIM) y técnicas de cultivo. Después de la concentración de la muestra por SIM, el conjugado de perlas fue sembrado en placas de agar Columbia suplementado con sangre y se incubaron de 3 a 5 días en condiciones de microaerofilia a 37°C; posterior a la incubación, seleccionaron las colonias pequeñas, de color gris y les realizaron coloración de Gram y pruebas bioquímicas. En un total de 23 de los 132 aislamientos de los cultivos se confirmó que eran *H. pylori* por amplificación y posterior secuenciación del gen 16S ARNr.

Moreno y Ferrús (2012) utilizaron una técnica de filtración por membrana modificada para la detección de *H. pylori* a partir de muestras de aguas superficiales y residuales. Los filtros fueron inoculados en caldo Columbia para preenriquecimiento y la muestra fue colocada directamente sobre Agar pylori y Agar base Columbia suplementado con 10% de sangre de caballo desfibrinada y DENT. De esta forma obtuvieron un cultivo positivo de *H. pylori* pero, debido a la imposibilidad para aislar las colonias por el crecimiento simultaneo de microbiota interferente en las placas, la

identificación específica de la bacteria solo se logró con técnicas moleculares como FISH y PCR.

En la actualidad no se cuenta con un medio de cultivo específico para la detección de *H. pylori* en diferentes matrices, es por esto que la mayoría de autores recomiendan el uso de técnicas moleculares para su detección (Douterelo *et al.*, 2014; Nayak y Rose, 2007; McDaniels *et al.*, 2005).

### **2.3.4.2. Técnicas Moleculares**

#### **2.3.4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR**

El fundamento de la PCR es la amplificación *in vitro* de ADN mediante el uso de enzima ADN-polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que delimitan el fragmento a amplificar (Mullis, 1990). Entre las ventajas de esta técnica destacan su sencillez, rapidez y sensibilidad. Además, se requiere muy poco material biológico de partida, mientras que la mayoría de análisis químicos precisan de grandes cantidades (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Debido a la sencillez de la técnica, su uso en los laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección microbiológica. Problemas tales como la dificultad de detección de determinados virus y la imposibilidad de aislamiento de algunos microorganismos por su dificultad o incapacidad para desarrollarse *in vivo* pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa a veces obligada para su uso en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico como es el caso de la medicina forense, identificación genética o control de calidad de las industrias (Kabir, 2004).

Uno de los inconvenientes de la técnica de la PCR convencional es que no discrimina entre células vivas y muertas, e incluso puede amplificar restos de ADN procedentes de células inactivadas (Tamay de Dios *et al.*, 2013). En cuanto a la metodología, las principales dificultades incluyen hacer accesibles los ácidos

nucleicos y eliminar los inhibidores de la reacción de PCR en un rango amplio de matrices complejas (Wilson, 1997). En este sentido, *H. pylori* presenta el inconveniente adicional de poder encontrarse en el agua en forma de células viables no cultivable con paredes celulares más inaccesibles, lo que dificulta la extracción de ADN para su análisis (Boehnke *et al.*, 2018; Orta De Velásquez *et al.*, 2016).

Un aspecto importante para el éxito de la PCR es el diseño de los iniciadores. Son moléculas de ADN monocatenario de entre 15 y 30 nucleótidos que la polimerasa emplea para comenzar a polimerizar, de forma que el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ADN lo establece la posición del iniciador. Es condición indispensable que los iniciadores sean específicos del ADN que se vaya a amplificar. En la mayoría de los casos, conocer la secuencia completa del microorganismo de interés es muy complicado y por lo tanto es habitual recurrir a la información recopilada por otros investigadores y almacenada en bases de datos. La recopilación de secuencias de 16S y del 23S en los bancos de datos es una excelente ayuda a los investigadores en el desarrollo de nuevos iniciadores para la detección mediante PCR (Bou *et al.*, 2011).

La PCR se ha empleado en una gran cantidad de estudios para detectar *Helicobacter* en un variado tipo de muestras: placa dental y saliva (Song *et al.*, 2000); heces (Lu *et al.*, 2002); leche cruda (Rahimi y Kheirabadi, 2012; Doyle, 2002); vegetales (Atapoor *et al.*, 2014) y moluscos (Fernández *et al.*, 2007). Existen diversos trabajos en los que ha sido detectado *H. pylori* en aguas superficiales y residuales mediante PCR (Moreno y Ferrús 2012; Krumbiegel *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2003a; Horiuchi *et al.*, 2001).

La PCR es un método que permite la amplificación de genes específicos para detectar *H. pylori* en distintas fuentes de agua. Algunos de ellos, como *ureA* (ureasa) (Cuervo *et al.*, 2017); *hpaA* (adhesina) (Janzon *et al.*, 2009); *cagA* (proteína CagA) (Chomvarin *et al.*, 2017); *vacA* (Morenoy Ferús, 2012) y *glmM* (fosfoglucosamina mutasa) (Bahrami *et al.*, 2013), son los comúnmente seleccionados con la finalidad de evitar la reactividad cruzada entre *H. pylori* y otras especies del mismo género o con otras bacterias (Azis *et al.*, 2015). Sin embargo, otras especies bacterianas

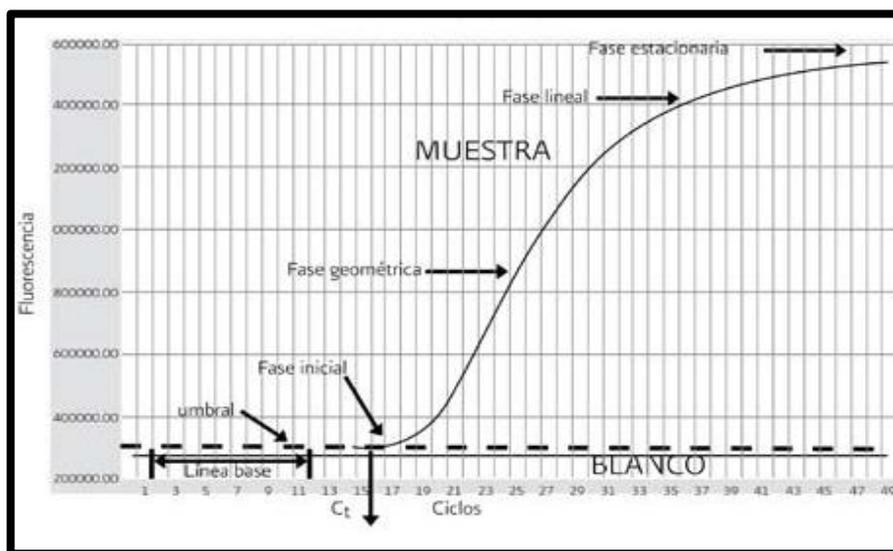
estrechamente relacionadas y subespecies desconocidas del género *Helicobacter* podrían interferir en los ensayos de PCR y debe tenerse en cuenta la obtención de resultados discrepantes entre distintos autores en los análisis de las muestras ambientales (Fernández-Delgado *et al.*, 2008; Engstrand, 2001; Park *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1995).

Lu *et al.* (2002) utilizaron la PCR para verificar los aislamientos de *H. pylori* a partir de aguas residuales municipales no tratadas de la ciudad de Juárez (México). En el estudio utilizaron secuencias de iniciadores para el gen 16S rRNA y las formas alélicas del gen *vacA* (*vacA s1a*, *vacA s1b*, *vacA s2*, *vacA m1* y *vacA m2*). La mayoría de aislamientos positivos pertenecían al genotipo *vacA s1a/m1*, combinación alélica que se ha informado está asociada frecuentemente con la formación de úlcera gástrica. Estos hallazgos sugieren que las aguas contaminadas con materia fecal, puede ser una posible fuente de transmisión fecal-oral de *H. pylori*. Moreno y Ferrús (2012) utilizaron la PCR para la detección de *H. pylori* en aguas residuales tratadas usando secuencias de oligonucleótidos que codifican para el gen *vacA* y en sus resultados destacan la presencia de *H. pylori* en el agua después del tratamiento secundario e incluso en el efluente final después de la desinfección terciaria del agua residual.

#### **2.3.4.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real - qPCR**

La qPCR es una técnica que combina la detección y la cuantificación en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a  $10^7$  equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl *et al.*, 2001) y rapidez en la visualización del producto, ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Es una herramienta poderosa, simple y rápida y está destinada a sustituir a muchas técnicas tradicionales en los laboratorios de microbiología. De esta forma, estableciendo el nivel umbral sobre la señal de fluorescencia basal, es posible determinar el ciclo en el cual se inicia la fase exponencial de la amplificación del ADN (ciclo umbral,  $C_T$  "threshold cycle"),

el cual está relacionado directamente con la cantidad de ADN diana inicial y es el parámetro utilizado en la cuantificación (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Nazarenko *et al.*, 1997; Heid *et al.*, 1996).



**Figura 5.** Representación gráfica del aumento de la fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de  $C_T$  (Tomado de: [https://www.researchgate.net/publication/259042551\\_PCR\\_en\\_tiempo\\_real/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real/figures?lo=1)).

El objetivo de la q-PCR es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. La fluorescencia de las sondas unidas al ADN se monitoriza en cada ciclo de PCR. Las reacciones son reconocidas como positivas por algoritmos que analizan los cambios de fluorescencia en cada ciclo. En la detección cuantitativa, la construcción de una curva estándar o recta patrón a partir de concentraciones conocidas de ADN diana permite la cuantificación de la muestra problema mediante la interpolación de los valores obtenidos. Además, la PCR a tiempo real también permite el análisis, ya que las curvas de fusión identifican productos de PCR y variaciones en la secuencia de nucleótidos por sus temperaturas de fusión (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La máxima amplificación que se puede obtener en un ciclo es conocida como eficiencia de la PCR. La eficiencia depende básicamente de los iniciadores y de las condiciones de temperatura de la reacción y se define como el número de copias en

el ciclo  $n+1$  dividido por el número de copias en el ciclo  $n$ . Una reacción con eficiencia del 100% (equivaldría a 2) duplicaría el ADN cada ciclo de amplificación. La eficiencia de una reacción de amplificación se aproxima a 2 durante la fase exponencial de la mayoría de las reacciones bien optimizadas.

En los equipos actuales para q-PCR la amplificación y la detección de fluorescencia se desarrollan en un mismo tubo. Éste no se abre nunca durante el proceso, y el uso de dUTP y Uracil DNA glicosilado impide todo riesgo de contaminación. Además, dada la detección fluorimétrica de los amplificados, no se requiere electroforesis y evita los problemas de contaminaciones derivados de la apertura de los tubos (McKillip y Drake, 2004; Wilhelm y Pingoud, 2003). Así pues, la PCR a tiempo real puede integrar la detección, cuantificación y el análisis de microorganismos en un solo ensayo de forma rápida y eficaz.

Uno de los termocicladores de capilares más utilizados, y el que se ha empleado en este estudio, es el LightCycler® 2.0 de Roche (Figura 6). Este instrumento emplea para la detección un fluorímetro de tres canales. Un diodo azul (LED) con una emisión máxima de 470 nm sirve como fuente de energía para la excitación de las muestras. La fluorescencia se detecta a 530 nm, 640 nm y 710 nm con la ayuda de fofohíbridos. Estos tres canales de detección permiten el marcaje de las muestras con varios fluorocromos, lo que posibilita el trabajo con PCR múltiple y la detección de 2 o incluso más mutaciones simultáneamente. Los nuevos termocicladores para PCR a tiempo real poseen 6 canales de detección, permitiendo así el análisis a varias longitudes de onda de emisión (530, 555, 610, 640, 670 y 705 nm), lo que posibilita la medida de emisiones de cuatro fluorocromos distintos ([www.roche-mb.com](http://www.roche-mb.com)).



**Figura 6.** LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche, Francia, [www.roche.com](http://www.roche.com))

El sistema permite el empleo de distintos protocolos para la incorporación y detección de la fluorescencia ([www.Roche-mb.com](http://www.Roche-mb.com)). La detección de fluorescencia puede realizarse mediante sistemas inespecíficos o específicos de secuencia (Lee *et al.*, 2004).

#### Sistemas específicos: Sondas de hibridación

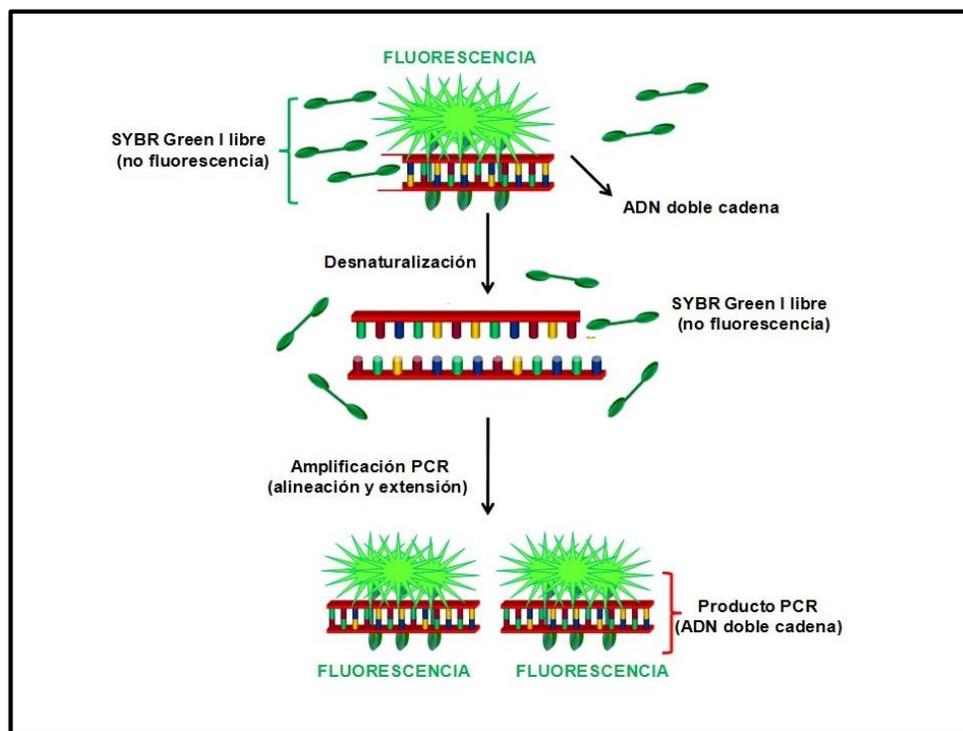
En los sistemas específicos de secuencia se utilizan sondas marcadas con fluoróforos, cuya diana se encuentra en el producto de amplificación, constituyendo un elemento más para conseguir la especificidad deseada. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente entre las moléculas. El método utiliza fluoróforos que actúan como donadores o aceptores de fotones y están unidos a una o varias sondas. Las sondas de hibridación específicas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas tipo “molecular beacons” y las sondas FRET (Lejona *et al.*, 2006).

#### Sistemas inespecíficos: Agentes intercalantes

Esta metodología se basa en el uso de fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo de la PCR se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Uno de los más ampliamente empleados, por su facilidad de utilización y disponibilidad comercial, y que ha sido utilizado en este trabajo, es el

SYBR Green I (Figura 7). La excitación de la molécula se produce con luz azul a una longitud de onda de 480 nm y el espectro de emisión es comparable al de la fluoresceína, con un máximo de 520 nm. La fluorescencia del colorante unido al ADN es 1000 veces superior que cuando está libre y por tanto es muy adecuado para la monitorización del aumento del producto de amplificación durante la PCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Morrison *et al.*, 1998).

El uso de agentes intercalantes permite, además, comprobar que el producto de amplificación es el esperado: Cada fragmento de amplificación tiene una temperatura de fusión ( $T_m$ ) característica, que es aquella temperatura a la cual el 50 % del ADN amplificado se ha desnaturalizado o liberado de la doble cadena. Esta temperatura depende sobre todo de la longitud y de la composición de las bases (contenido en G + C) del fragmento de amplificación (Tamay de Dios *et al.*, 2013). La  $T_m$  será la misma para todos los productos de PCR obtenidos con un determinado par de iniciadores, y es característica de cada amplicon, independientemente de las condiciones de la PCR. Por tanto, de la medida de la  $T_m$  durante la PCR se obtiene una curva de fusión que permite comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (Ririe *et al.*, 1997), así como comprobar la ausencia de productos de amplificación de PCR inespecíficos que podrían interferir en la cuantificación (Simpson *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Mecanismo de acción del SYBR Green I (www.roche.com.)

Numerosos grupos de investigación han llevado a cabo trabajos para determinar la presencia de *H. pylori* en muestras ambientales mediante el uso de esta técnica. Nayak y Rose (2007) utilizaron el método qPCR con SYBR Green para investigar la ocurrencia de la bacteria en las aguas residuales, y determinar las concentraciones de *H. pylori* en el agua. Sus resultados demostraron que la qPCR es un método específico, sensible y rápido para la detección cuantitativa de *H. pylori* en las aguas residuales. Adicionalmente, concluyeron que este método es muy valioso en el estudio de la prevalencia de *H. pylori* en aguas y para determinar la posible presencia de formas viables pero no cultivables de *H. pylori* en el agua. Sen *et al.* (2007) desarrollaron un control interno para la evaluación y estandarización del método de qPCR para la detección de *H. pylori* en agua potable, y encontraron que, con las modificaciones realizadas al método, éste puede detectar DNA de *H. pylori* en niveles tan bajos como 5 a 10 células/litro de agua. Janzon *et al.* (2009) desarrollaron, probaron y optimizaron dos ensayos complementarios de qPCR específicos para la cuantificación de ADN de *H. pylori* en el agua. En su estudio determinaron que el nivel

mínimo de detección es de aproximadamente 250 unidades genómicas de *H. pylori* por muestra de agua.

#### 2.3.4.2.3. Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

Durante los últimos años se utiliza cada vez más la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes de oligonucleótidos dirigidas al ARNr (FISH) para la detección e identificación de especies microbianas en muestras ambientales y la visualización de microorganismos morfológicamente intactos en su ambiente natural (Moreno *et al.*, 2007; Piqueres *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2003a; Amann *et al.*, 1995).

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada por fluorescencia, que hibrida específicamente con la secuencia complementaria sin dañar la célula. Esta técnica tiene la gran ventaja que no es inactivado por los inhibidores que puedan encontrarse en las muestras. También permite la detección de formas viables pero no cultivables, las cuales algunas veces no son detectadas por PCR debido al poco contenido de ADN (Moreno *et al.*, 2003a; Amann *et al.*, 1995).

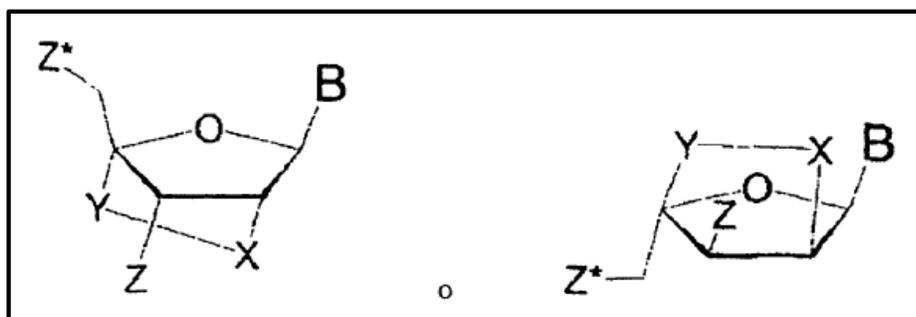
La mayor limitación del método es su sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde se esté hibridando. El método utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal (Fuchs *et al.*, 2001).

La parte más crítica de esta técnica es el diseño de las sondas, que deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que se desea detectar. Según la molécula de ARNr que vayamos a estudiar (16S o 23S), hay que tener en cuenta la zona a la que se quiere acceder con la sonda, ya que existen zonas más accesibles que otras debido a la conformación de la molécula de ARN. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 pares de bases y las más cortas son las que presentan una mayor accesibilidad, aunque pueden llevar menos marcadores (Fuchs *et al.*, 2001).

Existen diferentes métodos de marcaje de sondas. El marcaje fluorescente directo es el más usado, ya que es rápido, barato y fácil, y no requiere ningún paso posterior de detección tras la hibridación. Una o más moléculas de colorante fluorescente se unen al oligonucleótido, bien químicamente durante la síntesis a través de un aminoenlace en el extremo 5´ terminal de la sonda, o enzimáticamente, utilizando una transferasa terminal que une los nucleótidos marcados fluorescentemente al extremo 3´ terminal (Fuchs *et al.*, 2001). Los fluorocromos de última generación emiten una señal fluorescente más intensa y son mucho más estables frente a la luz (Amann *et al.*, 1990).

El uso de sondas FISH modificadas tipo LNA (Locked Nucleic Acid) para la hibridación *in situ* hace posible aumentar la especificidad y la sensibilidad de unión con las regiones de ARNr, debido a sus excelentes propiedades térmicas. Las sondas LNA son sondas con una modificación en su anillo de ribosa. Esta modificación consiste en la formación de un puente que conecta el oxígeno 2' con el carbono 4', que confiere a la sonda un aumento en la estabilidad térmica, así como un aumento en la especificidad (Figura 8). Por cada nucleótido LNA que contenga la sonda, se posibilita un aumento entre 1-8 °C en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del duplex de ARN-ADN, lo que le confiere mayor estabilidad en condiciones de hibridación más restrictivas y por tanto más selectivas.

El uso de sondas LNA hace posible que la temperatura de fusión pueda alcanzar valores elevados aun tratándose de fragmentos cortos y resultan muy adecuadas para la hibridación *in situ* bajo condiciones estrictas. Se ha demostrado que las sondas FISH modificadas con LNA superan a las sondas convencionales de ADN en la detección de fragmentos de ARN (Rune *et al.*, 2005).



**Figura 8.** Estructura del monómero de LNA. B: Base; Z: grupo terminal (OH); Z\*: grupo de enlace internucleosídico (OH); Y: CH<sub>2</sub>; X: grupo constitutivo O, S, NR.

Pocos estudios han evaluado la efectividad de FISH para la detección directa de células viables de *H. pylori* en muestras de agua superficial, potable, marina (Moreno-Mesonero *et al*, 2016; Tirodimos *et al*, 2014; Gião *et al*, 2011; Piqueres *et al*, 2006) y agua tratada con hipoclorito de sodio (Moreno *et al.*, 2007). Moreno *et al.* (2003a) la emplearon para la detección de *H. pylori* en agua de río y aguas residuales, comparando su eficacia con métodos de cultivo y PCR, detectando más muestras positivas que mediante PCR. Aunque esta técnica necesita una evaluación más exhaustiva, ha demostrado ser sensible, específica, cuantitativa y rápida para detectar células completas de *H. pylori* en muestras ambientales.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Determinar la presencia, viabilidad y virulencia de *H. pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización de la ciudad de Bogotá.

### **3.2. Objetivos específicos**

**3.2.1.** Evaluar la eficacia de diversos métodos de cultivo para la detección de *H. pylori* en aguas crudas y potables.

**3.2.2.** Evaluar la eficacia de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y la PCR cuantitativa a Tiempo Real (q-PCR) para la detección de *H. pylori* en aguas crudas y potables.

**3.2.3.** Determinar los niveles de contaminación por *H. pylori* de las aguas crudas y potables en las tres plantas de potabilización estudiadas.

**3.2.4.** Estudiar la distribución de los distintos marcadores genéticos de virulencia de *H. pylori* en las aguas crudas y potables analizadas.

**3.2.5.** Determinar si existe relación entre los indicadores de contaminación fecal (coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor) y la presencia de *H. pylori* en aguas crudas y potables.

**3.2.6.** Determinar si existe relación entre los parámetros físico-químicos de control diario de las plantas de potabilización y la presencia de *H. pylori* en aguas crudas y potables.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 4.1. CEPAS BACTERIANAS

Para la realización de este estudio se emplearon un total de 10 cepas de referencia. Entre ellas se incluyeron cepas del género *Helicobacter* y cepas representantes de especies bacterianas presentes de forma habitual en las matrices ambientales objeto de este estudio, procedentes de la American Type Culture Collection, United States of America (ATCC), National Collection of Type Cultures, Reino Unido (NCTC) y de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cepas utilizadas en el estudio

ESPECIE	CEPA - ORIGEN
<i>Arcobacter cibarius</i>	NCTC 11885
<i>Campylobacter jejuni</i>	NCTC 11168
<i>Clostridium spp.</i>	CMPUJ 262 (Cepa de suelo/CMPUJ)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11637
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11638
<i>Helicobacter pylori</i>	301 A (Cepa de Biopsia gástrica humana/CMPUJ)
<i>Helicobacter pylori</i>	305 C (Cepa de Biopsia gástrica humana/CMPUJ)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 13076

#### 4.1.1. Condiciones de cultivo de las cepas de referencia

El cultivo de las cepas de *H. pylori* se llevó a cabo en Agar Brucella Suplementado (ABS) (Anexo I) a 37°C durante 72 horas en condiciones de microaerofilia (5% de oxígeno, 11% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno) en incubadora de anaerobiosis (Thermo Scientific, USA).

El resto de especies incluidas en el estudio se sembraron en un agar nutritivo (Merck, USA) y se incubaron en condiciones adecuadas para su crecimiento, según el manual de manejo de cepas del laboratorio de Indicadores de aguas y lodos (DM-LIAL-PT 035).

Todas las cepas incluidas en el trabajo se conservaron por duplicado a -20°C y -80°C en caldo nutritivo adicionado con un 20 y un 50% de glicerol, respectivamente.

#### 4.2. OBTECIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas durante un año, en el periodo comprendido entre julio de 2015 y agosto de 2016, con una frecuencia semanal. Las muestras procedían de 3 plantas o empresas de tratamiento de agua potable (PTAP o ETAP) ubicadas en la ciudad de Bogotá. Se tomó una muestra a la entrada de cada planta (agua cruda) y otra a la salida de la misma (agua potable).

##### 4.2.1. Estaciones de muestreo – Plantas de Tratamiento de Agua Potable (PTAP)

**4.2.1.1. PTAP 1:** Ubicada al norte de Bogotá, capta el agua del río Bogotá, la cual es llevada a través de una bocatoma a una laguna o dársena con un tiempo de retención hidráulica de 84 horas. Allí el líquido pasa a dos estaciones de bombeo y llega al canal de aducción. Este proceso previo disminuye la concentración de materia orgánica y la carga microbiana por sedimentación. Trata un caudal promedio de 10.5 m<sup>3</sup>/s y distribuye el agua a 5 municipios de Cundinamarca y parte del norte de Bogotá.

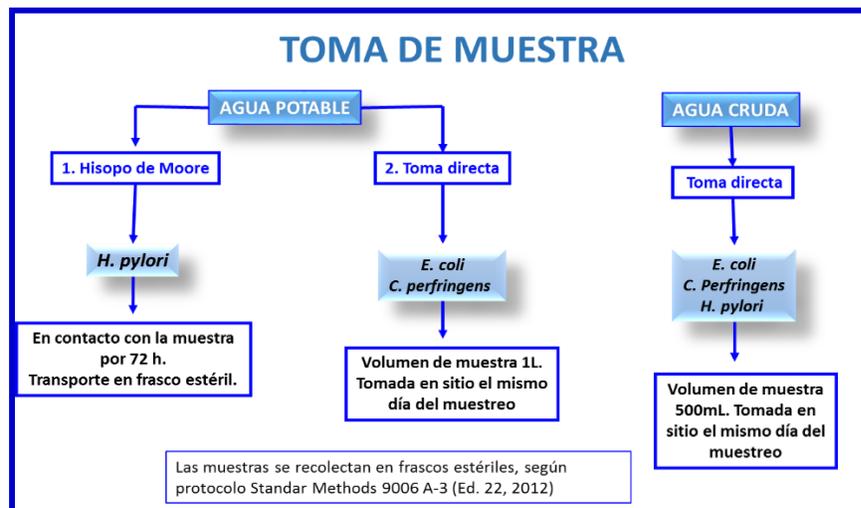
Tiene un sistema de tratamiento convencional, que consta de: pre-sedimentación, coagulación-floculación por medio de sulfato de aluminio, cloruro férrico y polímeros; sedimentación; filtración por medio de arena, antracita y grava estratificada y finalmente desinfección con cloro.

**4.2.1.2. PTAP 2:** Ubicada al sur de Bogotá, recibe agua de la cuenca alta del río Tunjuelo, el embalse la Regadera y Chisacá. Esta planta trata un caudal promedio de 1.6 m<sup>3</sup>/s y distribuye el agua al sector sur de Bogotá. El sistema de potabilización consiste en: un pre tratamiento donde el agua se estabiliza con cal hidratada; coagulación–floculación con sulfato de aluminio granulado; sedimentación; filtración de flujo descendente por medio de lecho de antracita y desinfección con cloro.

**4.2.1.3. PTAP 3:** Ubicada al noreste de Bogotá, recibe agua del páramo de Chingaza y el río Teusacá, los cuales se unen en el embalse San Rafael. Esta planta trata un caudal promedio de 14 m<sup>3</sup>/s y distribuye agua al municipio de la Calera y al 70% de la ciudad de Bogotá. Su tratamiento se inicia con un proceso de aireación; posteriormente el agua pasa a través de tuberías donde se le adiciona sulfato de aluminio y polímeros catiónicos; a continuación, se realiza una filtración directa con arena y antracita y finaliza el proceso mediante desinfección con cloro.

#### 4.2.2. Toma de muestra

La toma de muestras para los análisis de coliformes totales, *Escherichia coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual Standard Methods 9006 A-3 (APHA, 2012). Para la toma de la muestra se utilizó un recipiente estéril de polietileno con capacidad de 1000 mL (para análisis de coliformes totales y *E. coli* en agua potable) y 500 mL (para todos los análisis del agua cruda y la determinación de esporas *Clostridium* sulfito reductor en agua potable) debidamente marcados, indicando: sitio de muestreo tipo de muestra, fecha y hora de la toma de la muestra y responsable del muestreo, junto con el diligenciamiento del documento de trazabilidad del muestreo denominado “cadena de custodia” (DM-LIAL-F 024, Anexo VIII) (Figura 9).



**Figura 9.** Metodología para la toma de muestras de agua potable y cruda.

#### 4.2.2.1. Toma de muestra de Agua Potable

##### 4.2.2.1.1. Toma de muestras de 1000 y 500 mL de agua potable para análisis de coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor

Se tomó el frasco de 1000 mL que contiene tiosulfato al 3%, se destapó procurando no contaminar la superficie interna de la tapa ni el cuello de la botella. El frasco se colocó justo debajo de la corriente de agua del grifo y se tomó la muestra de agua sin llenar completamente el recipiente de muestreo, teniendo precaución en dejar la cámara de oxígeno, alrededor del 20% del frasco vacío. La botella se tapó inmediatamente (Figura 11).

Para la detección de esporas de *Clostridium* sulfito reductor, se utilizó el frasco de 500 mL y se destapó procurando no contaminar la superficie interna de la tapa ni el cuello de la botella. El frasco se colocó justo debajo de la corriente de agua (del grifo) y se tomó la muestra de agua. La botella se llenó completamente, sin dejar cámara de oxígeno. La muestra se identificó de acuerdo a lo anteriormente descrito (sección 4.2.2).

Después de ser recolectada la muestra, se mantuvo a una temperatura de 6 – 8°C hasta su llegada al laboratorio. Las muestras se procesaron antes de 24 horas a partir del momento de recolección.

#### **4.2.2.1.2. Toma de la muestra de agua potable utilizando el método del “hisopo de Moore”, para el análisis de *H. pylori***

Para la preparación del “hisopo de Moore” (OPS/OMS, 2010) se cortó un trozo de gasa de 40 cm. de ancho x 90 cm. de largo. La gasa se dobló hasta obtener un cilindro de 10 cm. de largo por 4 cm. de diámetro. El centro del cilindro de gasa se ató a una cuerda de nylon de 5 metros de longitud. Se colocó en papel kraft y se esterilizó a 121°C / 15min (Figura 10).



**Figura 10.** “Hisopo de Moore” utilizado para la toma de muestra de *H. pylori* en agua potable.

El hisopo se extrajo de su envase, se colocó en el lugar seleccionado a una profundidad de 20-30 cm (Figura 11). Después de 72 horas el hisopo se retiró y se colocó en un recipiente hermético estéril de boca ancha de 500 mL. El mantenimiento e identificación de la muestra se realizaron de acuerdo a lo descrito anteriormente (sección 4.2.2 y 4.2.2.1.1).

#### **4.2.2.2. Toma de muestra de agua cruda, para análisis de coliformes totales, *E. coli*, esporas de *Clostridium* sulfito reductor y *H. pylori***

Se usaron dos recipientes, uno de 500 y el otro de 250 mL. Se tomó la muestra utilizando el frasco muestreador que existe en la planta en el punto de entrada del agua cruda (Figura 11). Se retiró la tapa del frasco de muestreo, procurando no contaminar la superficie interna de la tapa ni el cuello de la botella. La muestra se recolectó teniendo en cuenta que se debe hacer aproximadamente en el centro de la boca de toma y a 10 cm de profundidad, sumergiendo el recipiente boca abajo y posteriormente dirigiendo la boca contra la corriente. La botella de 500 mL se llenó dejando un volumen vacío aproximado del 20%, para la cámara de oxígeno, y se cerró.

Para la muestra de esporas de *Clostridium* sulfito reductor, se utilizó la botella de 250 mL, la cual se llenó completamente, sin dejar cámara de oxígeno, y fue cerrada inmediatamente. El mantenimiento e identificación de la muestra se realizaron igual que como se describió anteriormente (sección 4.2.2 y 4.2.2.1.1).



**Figura 11.** Toma de muestras de agua potable y cruda.

### 4.3. CONCENTRACIÓN DE *H. pylori* A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA

Para la concentración de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda y potable se utilizaron las técnicas de centrifugación y separación inmunomagnética (SIM).

#### 4.3.1. Centrifugación de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda

Para realizar la concentración de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda, se tomaron 200mL de muestra de cada planta de tratamiento de agua (PTAP 1, 2 Y 3), que se centrifugaron a 3000 x g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2mL de PBS 1X estéril (Anexo II). Se tomó 1 mL de esta suspensión, para realizar la concentración de *H. pylori* por la técnica de separación inmunomagnética. El otro mL se utilizó para los ensayos que se realizaron sin concentrar por SIM.

#### 4.3.2. Recuperación de *H. pylori* a partir de muestras de agua potable

Para realizar la concentración de *H. pylori* a partir de muestras de agua potable se utilizó el método del “Hisopo de Moore”, como se describió anteriormente (sección 2.2.1.2). El hisopo se sumergió en 200mL de caldo Brucella (Becton Dickinson, Anexo I.3) enriquecido con Isovitalax 0,4% (Becton Dickinson BBL™, Anexo I.1.3) y Dent 0,2% (Oxoid, Anexo I.1.2) y se llevó a agitación a 500 rpm durante 30 min para elusión; luego el caldo se incubó a 37°C por 24 h en condiciones de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 11% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>). Pasado el tiempo de incubación, se tomaron 150mL de cada enriquecimiento y se centrifugaron durante 20 min a 3000 x g. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2mL de PBS 1X estéril. Se tomó 1 mL de esta suspensión y se realizó la concentración de *H. pylori* por la técnica de separación inmunomagnética.

#### 4.3.3. Concentración de *H. pylori* por separación inmunomagnética –SIM

El método de separación inmunomagnética utiliza perlas magnéticas sensibilizadas con anticuerpos monoclonales específicos frente a antígenos de la

superficie de *H. pylori*. Tras su unión, la muestra se somete a un campo magnético y estas perlas con la bacteria quedan retenidas y se pueden eliminar el resto de componentes de la muestra. Este concentrado se puede utilizar posteriormente en técnicas de cultivo y moleculares.

La sensibilización de las perlas se realizó según el protocolo propuesto por Enroth y Engstrand (1995). Brevemente: Un volumen de 3  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-*Helicobacter pylori* Ig de conejo (Dako, Dinamarca), a una concentración de 5.3 mg de proteína / mL, se incubó con 500  $\mu\text{L}$  de perlas magnéticas (6 to 7 x 10<sup>8</sup> perlas/mL) (Dynabeads™ M-280, Novex by Life technologies, Noruega) durante 24 horas a 4°C en agitación. Tras el periodo de incubación, se procedió a la eliminación del anticuerpo que no se unió a las perlas. Para ello se realizaron 3 lavados de las perlas con 1 mL de PBS 1X con un contenido de 0.1% de albumina de suero bovino (BSA, Sigma, USA) agitando a 18 rpm a 4°C, durante 30 minutos. Después del tercer lavado las perlas sensibilizadas se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X con un contenido de 0.02% de BSA y 0.02% de azida sódica y se conservaron a 4°C.

Una vez sensibilizadas las perlas se realizó la comprobación de unión de las perlas con las células de *H. pylori*. Para este ensayo se utilizó un cultivo de 72 horas de *H. pylori* NCTC 11637, que se resuspendió en 1 mL de PBS 1X; se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de perlas sensibilizadas y se procesó como se describe a continuación. Finalmente, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se colocó sobre un portaobjetos, se dejó secar, se realizó coloración de Gram y posteriormente se hizo observación por microscopía.

Para la concentración de las muestras por SIM, se utilizaron los sedimentos obtenidos por centrifugación de las muestras, tal como se describió en los apartados anteriores (sección 4.3.1 y 4.3.2). La metodología que se utilizó para el análisis fue la siguiente:

A 1mL del sedimento resuspendido en PBS 1X estéril se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de perlas sensibilizadas. La mezcla se agitó en un mezclador rotacional (Dynabeads™

MX1 mixer, Invitrogen, UK) a 18 rpm a 4°C durante 1h. Se usó un imán (MPC-s, Invitrogen, UK) para separar el complejo perlas / *H. pylori* del resto de muestra.

Se descartó el sobrenadante y el complejo perlas/*H. pylori* se resuspendió en 1mL de PBS 1X estéril, que se usó para los métodos propuestos en el presente estudio (cultivo, PCR, qPCR, FISH). Se utilizaron alícuotas de 400µL para extracción de ADN; 300µL se conservaron en caldo Brucella con 20% de glicerol a -80°C, 100µL para siembra en masa, y 200 µL para realizar pre-enriquecimiento y cultivo.

#### **4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* por CULTIVO A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA**

##### **4.4.1. Puesta a punto del método de cultivo para detección y determinación de la viabilidad de *H. pylori* a partir de muestras de agua**

Para el aislamiento de las células de *H. pylori* a partir de muestras de agua, se evaluaron 3 medios de cultivo diferentes:

1. Agar Brucella BBL™ (Becton Dickinson) suplementado con 5% de sangre de caballo desfibrinada, 0,2% de DENT (Oxoid) y 0,4% de Isovitalex (Becton Dickinson BBL™) (Anexo I.1).
2. Agar HP diseñado por Degnan *et al.* (2003). (Anexo I.2).
3. Agar HP (Degnan *et al.*, 2003) suplementado con los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico (25mg/L), sulfato de estreptomicina (25mg/L) y kanamicina (25mg/L) (Anexo I.2).

Para realizar la evaluación de los medios de cultivo se utilizaron las cepas de referencia *H. pylori* NCTC 11637, *H. pylori* NCTC 11638, *H. pylori* 301A y *H. pylori* 305C. Se llevaron a cabo diferentes ensayos para evaluar distintas metodologías:

1. Se preparó una suspensión bacteriana de cada cepa en agua destilada estéril, con una concentración de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  UFC/mL. A partir de estas se tomaron 200 µL y se sembraron por triplicado en cada medio de cultivo. Se incubaron por

un periodo de 3 a 5 días a 37°C en condiciones de microaerofilia, para determinar el tiempo óptimo de crecimiento de la bacteria en los medios de cultivo.

2. Se evaluaron 2 tipos de membranas de policarbonato de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y 0.45  $\mu\text{m}$ , para probar la efectividad de la filtración por membrana en la recuperación de *H. pylori* y eliminación de microbiota acompañante. 1 mL de las suspensiones bacterianas de concentración de  $10^6, 10^5$  y  $10^4$  ufc/mL se adicionaron a 20 mL de agua destilada estéril y se filtraron. Los filtros se colocaron en los medios de cultivo y se incubaron por un periodo de 3 a 5 días a 37°C en condiciones de microaerofilia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y con las 4 cepas de referencia de *H. pylori* mencionadas anteriormente.
3. Dos litros de agua potable se inocularon con 1 mL de una mezcla de las 4 cepas de referencia a una concentración de  $10^6$  ufc/mL. El frasco que contenía el agua se dejó en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente ( $16^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ). Pasado este tiempo, la muestra fue procesada de la siguiente forma:
  - a. Se filtraron 100 mL de agua utilizando los 2 filtros de membrana de tamaño de poro diferentes (0.22 y 0.45  $\mu\text{m}$ ); luego los filtros se colocaron sobre los medios de cultivo en evaluación.
  - b. 200 mL de muestra se centrifugaron a 3000 x g durante 20 min y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS 1X estéril. De esta suspensión se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron en masa en cada uno de los medios de cultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado, incubándose por un periodo de 5 a 14 días a 37°C en condiciones de microaerofilia.
4. Finalmente, utilizando la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637 se determinó el límite/la tasa de recuperación del medio de cultivo seleccionado. Para esto se utilizó una suspensión en agua destilada estéril de un cultivo de 48 horas, a la cual se le realizaron diluciones seriadas de:  $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$  y 10 ufc/mL. De cada 1 de estas concentraciones se sembraron 100  $\mu\text{L}$  en masa y se filtró 1 mL utilizando el filtro de membrana que arrojó los mejores resultados de recuperación en los ensayos mencionados anteriormente. Todas las placas se incubaron por un periodo de 5 a 14 días a 37°C en condiciones de microaerofilia. Los ensayos

se realizaron por triplicado. Como control negativo para todos ellos se utilizó *E. coli* ATCC 25992.

Una vez pasados los tiempos de incubación se realizó la verificación de los cultivos utilizando pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y oxidasa) y coloración de Gram.

#### 4.4.2. Metodología del cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua

De acuerdo a los resultados obtenidos de la puesta a punto del medio de cultivo que permite la mejor detección de *H. pylori* se utilizaron tres estrategias diferentes para su aislamiento e identificación a partir de las muestras de agua cruda y potable.

##### 4.4.2.1. Cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda

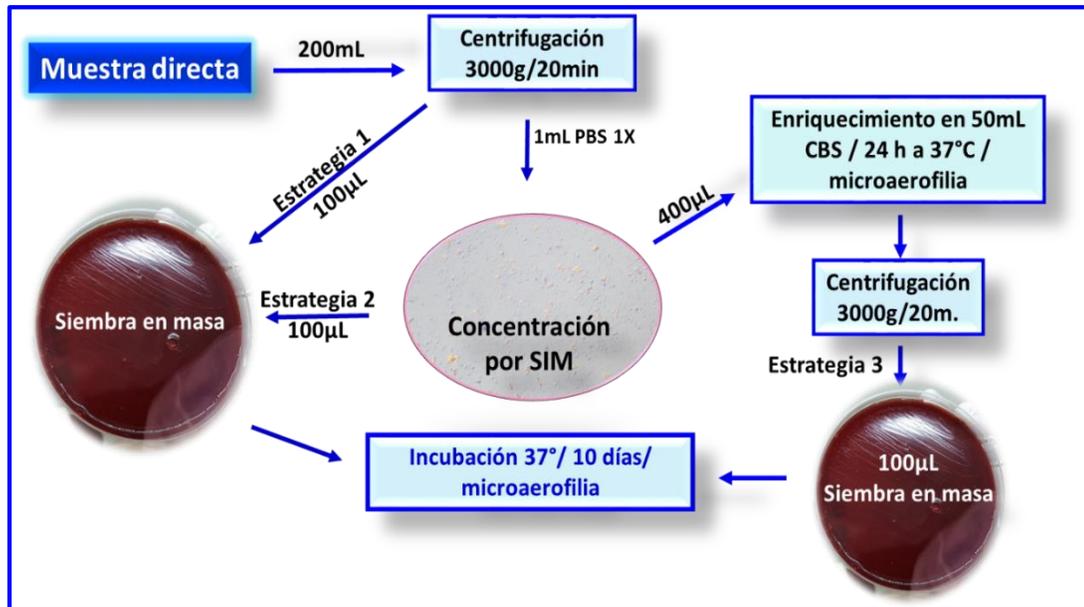
Para el cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda se utilizaron 3 estrategias:

**Estrategia 1:** Después de la centrifugación de la muestra, el sedimento fue resuspendido en PBS 1X (sección 4.3.1). De esta suspensión se tomaron 100µL y se sembraron en el medio de cultivo seleccionado.

**Estrategia 2:** Del concentrado obtenido por la técnica de separación inmunomagnética y resuspendido en PBS 1X (sección 4.3.3) se tomaron 100µL y se sembraron en el medio de cultivo seleccionado.

**Estrategia 3:** Finalmente, se tomaron 400µL del concentrado obtenido por la técnica de separación inmunomagnética y se enriquecieron en 50 mL de caldo Brucella suplementado con 0,4% de Isovitalex y 0,2% de Dent (Anexo I), por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación el caldo se centrifugó a 3000 g por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS 1X estéril. De esta suspensión se tomaron 100 µL y se sembraron en el medio de cultivo seleccionado.

Todas las placas de medios de cultivo de cada estrategia se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia por 10 días. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia: *H. pylori* NCTC 11637 y como control negativo *E. coli* ATCC 25992 (Figura 12).



**Figura 12.** Metodología de cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda.

#### 4.4.2.2. Cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua potable

El cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua potable se realizó después del enriquecimiento de la muestra en Caldo Brucella suplementado (con 0,4% de Isovitalax y 0,2% de Dent) y se utilizaron 3 estrategias:

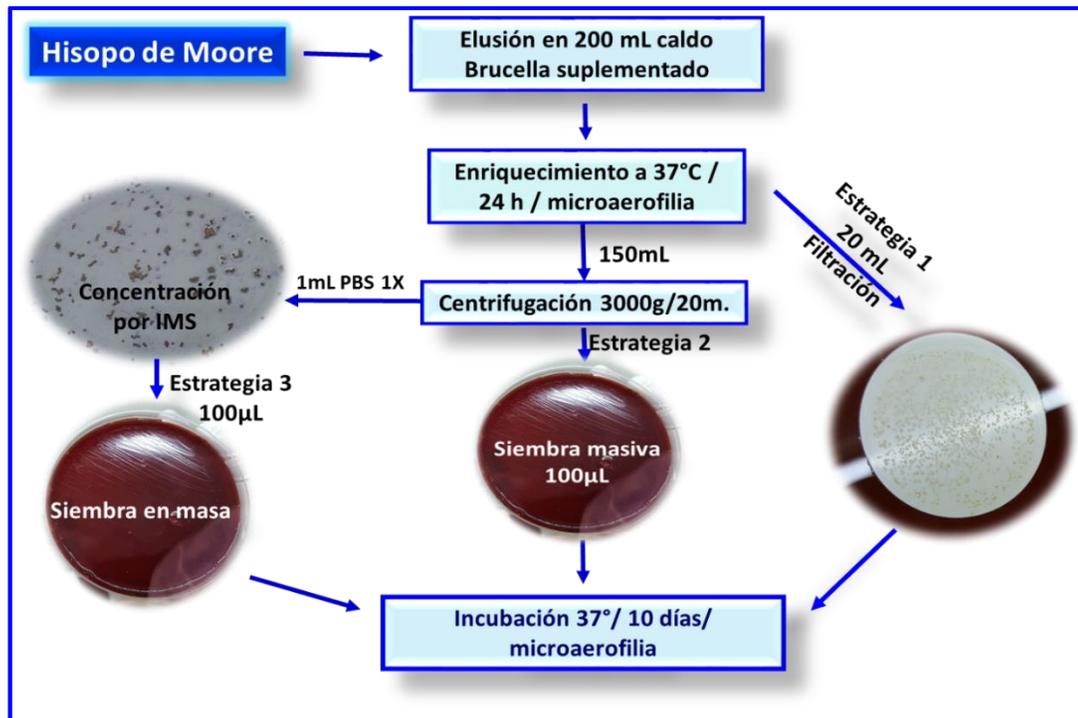
**Estrategia 1:** Se tomaron 20mL del caldo Brucella enriquecido, se filtraron usando una membrana de policarbonato y el filtro fue trasferido al medio de cultivo seleccionado.

**Estrategia 2:** 150mL de caldo Brucella pre-enriquecido fueron centrifugados a 3000g por 20 minutos; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en

2mL de PBS 1X. De esta suspensión se tomaron 100µL y se realizó siembra en el medio de cultivo seleccionado.

**Estrategia 3:** 100µL del concentrado obtenido por la técnica de separación inmunomagnética, aplicada al centrifugado anterior (sección 4.3.2) fueron sembrados en el medio de cultivo seleccionado.

Todas las placas de medios de cultivo de cada estrategia se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia por 10 días. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637 y como control negativo *E. coli* ATCC 25992 (Figura 13).



**Figura 13.** Metodología de cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua potable.

Tanto para aguas crudas como potables, después del tiempo de incubación las placas de cultivo fueron examinadas para determinar la presencia de colonias características de *H. pylori*. Las colonias presuntivas de *H. pylori* fueron subcultivadas

en el MCS y se les realizaron 3 pruebas bioquímicas, catalasa, oxidasa y ureasa, así como coloración de Gram para determinar la morfología de las células presentes.

#### **4.4.3. Identificación molecular de las colonias de *H. pylori* a partir de muestras de agua.**

Debido a la falta de un sistema de pruebas bioquímicas para la identificación específica de *H. pylori*, los cultivos se confirmaron mediante FISH y PCR con posterior secuenciación. Para ello, las colonias presuntivas de *H. pylori* que dieron positivas para las 3 pruebas bioquímicas fueron tomadas y resuspendidas en 2 mL de PBS 1X estéril. A partir de esta suspensión se tomó una alícuota para fijación por FISH en las condiciones descritas más adelante (sección 4.5.2.5.1) y otra para la extracción del ADN (sección 4.5.2.1).

Para la identificación y genotipificación de *H. pylori* por PCR convencional se utilizaron los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (formas alélicas *s1/s2* y *m1/m2*) y *glmM* en las condiciones descritas más adelante (sección 5.1.1.1).

Para confirmar definitivamente la identificación, los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori*, fueron analizados por PCR y qPCR mediante la amplificación de un fragmento del gen *vacA* y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados en las condiciones descritas más adelante (sección 4.5.2.3 y 4.5.2.4).

### **4.5. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA CRUDA Y POTABLE MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES - PCR, qPCR y FISH**

#### **4.5.1. Puesta a punto de los métodos moleculares para la detección y genotipificación de *H. pylori* a partir de muestras de agua**

##### **4.5.1.1. Aislamiento del ADN genómico bacteriano a partir de muestras de agua**

Para la obtención del ADN genómico se utilizó el sistema comercial de extracción “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se partió de cultivos puros utilizando las cepas de referencia *H. pylori* NCTC 11637, *H. pylori* NCTC 11638, *H. pylori* 301A y *H. pylori* 305C, de las cuales se tomó una cantidad aproximada de 10 µL, que se resuspendieron en 1 mL de tampón PBS 1X.

Para comprobar que la extracción de ADN se había realizado correctamente se preparó un gel con una concentración de 1% de agarosa en tampón TAE 1X (Tris-Acético-EDTA) teñido con 0.02% de SYBR® Safe–DNA gel stain (Invitrogen, USA). Se realizó la electroforesis del gel a 80 voltios durante 30 minutos. Al finalizar, la presencia de ADN se comprobó tras visualización en el equipo Gel Doc™ XR+ Imaging System Molecular Imager (BIO-RAD, USA).

#### **4.5.1.2. Puesta a punto de la PCR convencional para detección y genotipificación de *H. pylori* en muestras de agua**

Para la detección y genotipificación de *H. pylori* se utilizaron las PCR puestas a punto como se describe más adelante (sección 5.1.1.1) (Tabla 4).

La especificidad de los iniciadores se comprobó *in silico*, usando la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) y mediante amplificación de ADN de las cepas de referencia: *H. pylori* NCTC 11637 y 11638, *H. pylori* 301A y 305C y *E. coli* ATCC 25922.

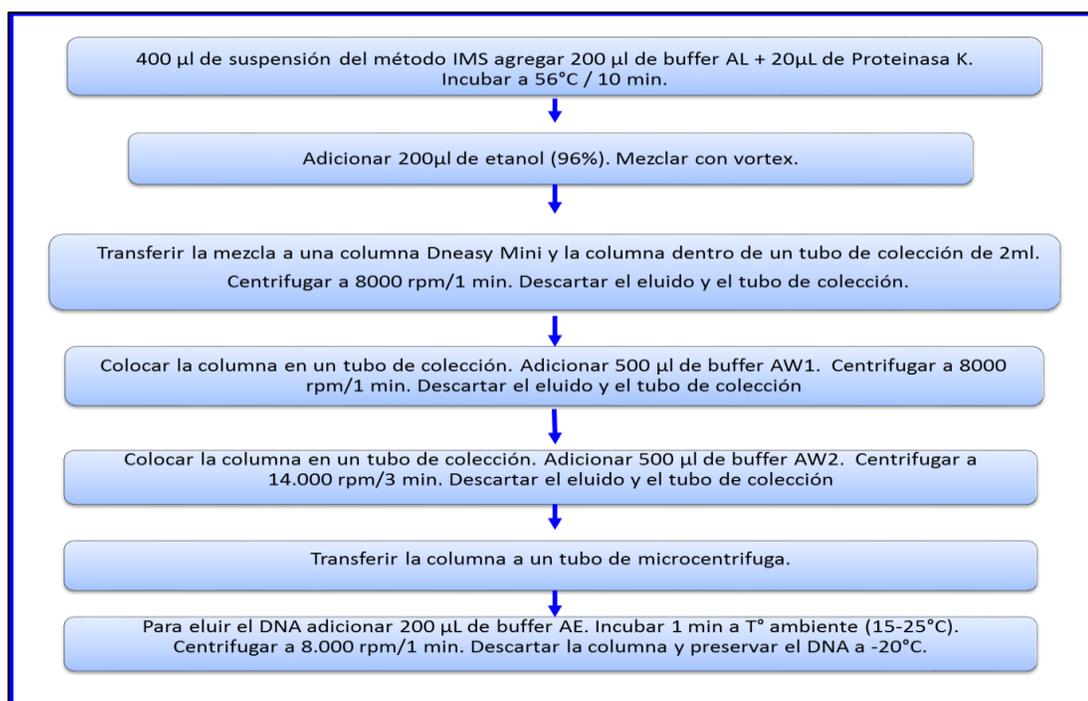
Para la puesta a punto de todas las reacciones de PCR se probaron diversas concentraciones de iniciadores y ADN. Las concentraciones de iniciadores que se evaluaron fueron 0.1, 0.3, 0.5  $\mu\text{M}$ , y de ADN 1, 2 y 5  $\mu\text{L}$ . Para cada gen en estudio se estandarizaron las temperaturas de hibridación de los iniciadores, para lo que se evaluó un rango de temperatura de 46° a 62°C. De igual forma se determinaron los tiempos de unión de los iniciadores, evaluando 30, 45 y 60 segundos.

La especificidad de los iniciadores se comprobó *in silico*, usando la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) y mediante amplificación de ADN de las cepas de referencia: *H. pylori* NCTC 11637 y 11638, *H. pylori* 301A y 305C y *E. coli* ATCC 25922.

#### **4.5.2. Detección e identificación de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda y potable mediante PCR, qPCR y FISH**

##### **4.5.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de las muestras de agua**

Para la obtención del ADN genómico se utilizó el sistema comercial de extracción “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En la Figura 14 se describe la metodología realizada para la extracción del ADN.



**Figura 14.** Metodología para la obtención del ADN genómico a partir de las muestras de agua cruda y potable.

#### 4.5.2.2. Detección y genotipificación de *H. pylori* presente en el agua por PCR convencional mediante la amplificación de los genes *ureA*, *cagA*, *glmM* y *vacA*

Para la detección de *H. pylori* presente en las muestras de agua se utilizaron los genes *ureA* (gen que codifica para una subunidad de la ureasa) y *glmM* (gen que codifica para la fosfogluocosamina mutasa).

Para la genotipificación de *H. pylori* presente en las muestras de agua se utilizaron los genes: *cagA* (gen que codifica la citotoxina CagA) y *vacA* (gen que codifica la proteína vacuolizante VacA, formas alélicas *s1*, *s2*, *m1* y *m2*). Para la amplificación de las formas alélicas *s1* y *s2*, se utilizaron un par de iniciadores que amplifican los dos alelos de forma simultánea, diferenciándose por el tamaño del fragmento que amplifican. De igual forma, se realizó para la amplificación de las formas alélicas *m1* y *m2* (Tabla 4).

A continuación, se describen las secuencias de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado de cada uno de los genes utilizados (Tabla 4).

**Tabla 4.** Secuencias de los iniciadores para amplificación de los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (*s1/s2* y *m1/m2*) y *glmM* de *H. pylori* por PCR

Gen blanco	Secuencia de los Iniciadores	Tamaño del Producto Amplificado	Referencia
<i>ureA</i>	F: 5'-GGGTATTGAAGCGATGTTTCCT -3' R: 5'-GCTTTTTTGCCTTCGTTGATAGT -3'	136 pb	Moreno <i>et al.</i> , 2003a y Twing <i>et al.</i> , 2011
<i>cagA</i>	F: 5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3' R: 5'-CTGCAAAGATTGTTTGCAGAGA- 3'	349 pb	Yamaoka <i>et al.</i> , 1998
<i>vacA</i> ( <i>s1/s2</i> )	F: 5'-ATGGAAATACAACAAACACC-3' R: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC- 3'	<i>s1</i> : 259 pb <i>s2</i> : 286 pb	Atherton <i>et al.</i> , 1995 y Erzin <i>et al.</i> , 2006
<i>vacA</i> ( <i>m1/m2</i> )	F: 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' R: 5'-GCGTCTAAATAATTCCAAGG- 3'	<i>m1</i> : 570 pb <i>m2</i> : 645 pb	Yamaoka <i>et al.</i> , 1998
<i>glmM</i>	F: 5'-TTATCGGTAAAGACACCAGAAA-3' R: 5'-ATCACAGCGCATGTCTTC-3'	134 pb	He <i>et al.</i> , 2002

Los ensayos de PCR se realizaron utilizando la mezcla comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega, M7123, USA) compuesta por un tampón de reacción (pH 8.5) que contiene la ADN Polimerasa, dATP 400µM, dGTP 400µM, dCTP 400µM, dTTP 400µM y MgCl<sub>2</sub> 3mM. El volumen final para cada reacción fue de 10 µL, con una concentración de 1U de master mix Taq polimerasa.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris-Acético-EDTA) teñido con 0.02% de SYBR® Safe-DNA gel stain (Invitrogen, USA), a 80 voltios durante 60 minutos. Al finalizar, la presencia de los fragmentos amplificados se comprobó mediante visualización en el equipo Gel Doc™ XR+ Imaging System Molecular Imager (BIO-RAD, USA).

#### 4.5.2.3. Confirmación de la presencia de *H. pylori* mediante secuenciación de los productos de PCR del gen *vacA* y análisis bioinformático

Para la amplificación por PCR convencional del gen *vacA* de *H. pylori* se utilizaron las secuencias de los iniciadores propuestos por Nilsson *et al.* (2002), que amplifican un fragmento de 372 pb del gen *vacA* (Tabla 6). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las establecidas por Piqueres *et al.* (2006) (Tabla 5).

La especificidad de todos los iniciadores utilizados en este estudio, se comprobó *in silico*, usando la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), y mediante amplificación de ADN de las cepas de referencia *H. pylori* NCTC 11637 y 11638, *H. pylori* 301A y *E. coli* ATCC 25922.

**Tabla 5.** Condiciones de la PCR para la amplificación del gen *vacA* de *H. pylori*.

Nombre Programa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)
Desnaturalización	1	95	0:05:00
Desnaturalización	33	94	0:01:00
Unión de iniciadores		57	0:01:00
Extensión del producto		72	0:01:00
Extensión Final	1	72	0:05:00
Enfriamiento	1	40	Continuo

Como volumen final de cada reacción se utilizaron 50  $\mu$ L, con una concentración de iniciadores de 0.5  $\mu$ L (10Mm), 1  $\mu$ L de ADN y 25  $\mu$ L de master mix Taq polimerasa (1U) (GoTaq® Green Master Mix, Promega, USA). Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis al 2% de agarosa teñido con 0.02% de SYBR® Safe–DNA gel stain (Invitrogen, USA).

Las muestras que presentaron un fragmento de 372 pb fueron confirmados por secuenciación utilizando el método de Sanger (Macrogen, Korea). Las secuencias fueron comparadas por alineamiento del gen *vacA* de *H. pylori* usando el software BLASTn (GenBank números de secuencias: AF049653.1 – CP003904.1AJ438914.1 – U95971.1 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 4.5.2.4. Detección y cuantificación de *H. pylori* presente en el agua mediante la amplificación del gen *vacA* por qPCR

El gen *vacA* es un gen constitutivo, presente en todas las cepas de *H. pylori* y se encuentra una sola copia del gen en el cromosoma de *H. pylori*, por tanto 1 unidad genómica (UG) equivale a 1 célula de la bacteria (Bernard *et al.*, 2005).

Para la amplificación de un fragmento de 372pb del gen *vacA* de *H. pylori* se utilizaron las secuencias de los iniciadores propuestos por Nilsson *et al.* (2002) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Secuencias de los iniciadores del gen *vacA* de *H. pylori*.

Nomenclatura iniciadores	Secuencia de nucleótidos
VacF	5'-GGC ACA CTG GAT TTG TGG CA- 3'
VacR	5'-CGC TCG CTT GAT TGG ACA GA- 3'

El volumen final de reacción fue de 20 µL con una concentración de: 2 µL de Light-Cycler® FastStart DNA SYBR Green I (Roche Applied Science, Spain), 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de cada iniciador (20 mM) y 2 µL de ADN. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las propuestas por Santiago *et al.* (2015) (Tabla 7). El ADN de la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637 fue utilizada como control positivo y las cepas *A. cibarus* NCTC 11885, *C. jejuni* NCTC 11168 y una mezcla de reacción sin ADN fueron utilizadas como control negativo en los análisis de qPCR.

**Tabla 7.** Condiciones de la qPCR para la detección de *H. pylori*.

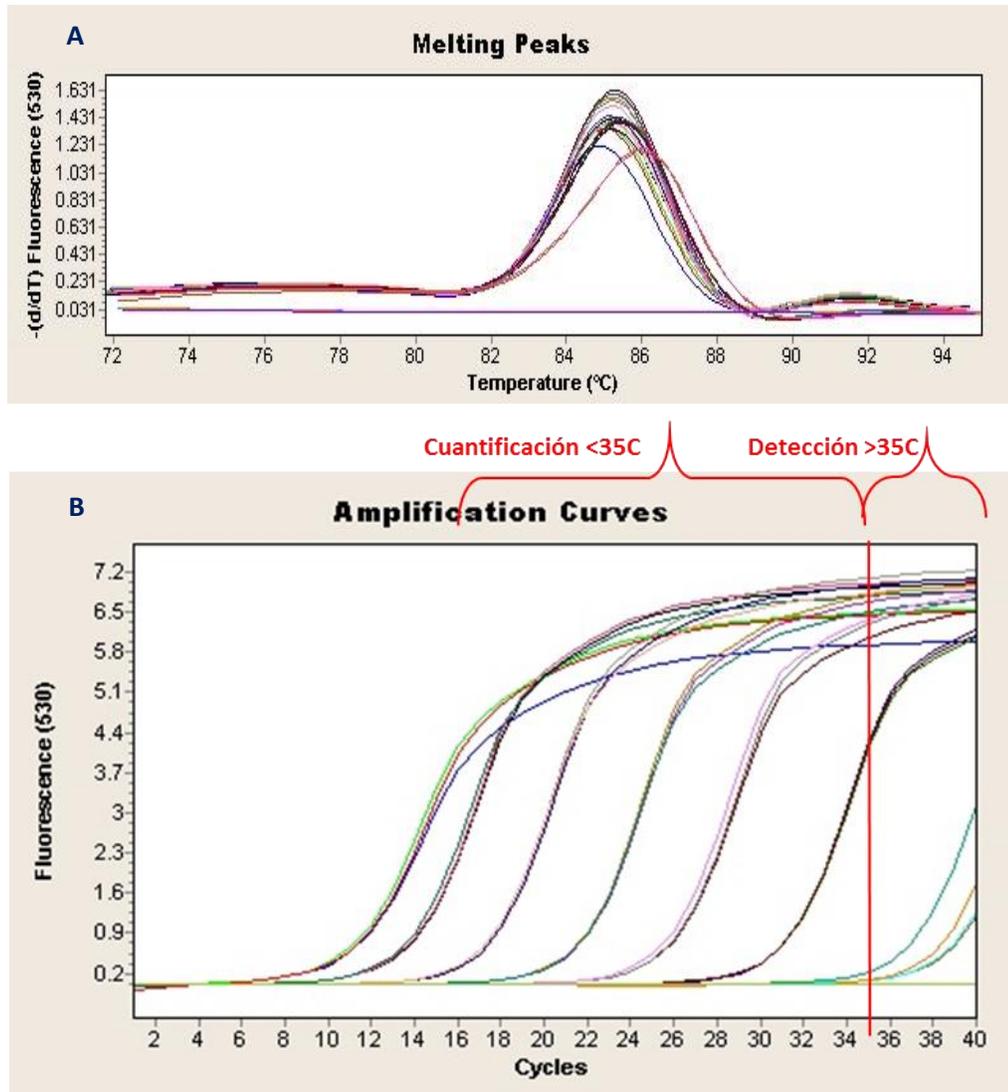
Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Rampa T° (°C/s)	Modo Adquisición
Denaturación	1	Ninguno	95	0:10:00	20	Ninguno
Amplificación	40	Cuantificación	95	0:00:10	20	Ninguno
			62	0:00:05	20	Ninguno
			72	0:00:16	20	Sencilla
Fusión	1	Curva fusión	95	0:00:00	20	Ninguno
			72	0:00:15	20	Ninguno
			95	0:00:00	0.1	Continuo
Enfriamiento	1	Ninguno	40	0:00:30	20	Ninguno

Para la cuantificación de *H. pylori* presente en las muestras de agua cruda y potable, se utilizó la curva estándar previamente descrita por Santiago *et al.* (2015). En resumen, se utilizó el ADN de la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637, se realizaron diluciones seriadas a concentraciones de  $10^6$  a 10 unidades genómicas (UG)/ $\mu\text{L}$ . Los análisis para cada dilución de ADN se realizaron por triplicado.

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) para los iniciadores *vacA* es de  $85^\circ\text{C}$ . Se tomaron como positivas las muestras que presentaron valores de  $T_m = 86.5$  y  $84.5^\circ\text{C}$  (Figura 15). La eficiencia de los análisis fue calculada por el método de la segunda derivada máxima, y se obtuvo una eficiencia de 1.853. El límite de cuantificación fue establecido en  $10 \log$  de unidades genómicas o células de *H. pylori*/ $\mu\text{L}$ , teniendo en cuenta que solo hay una copia del gen *vacA* en el genoma de *H. pylori*.

Adicionalmente, para la confirmación de todos los resultados positivos de la qPCR, los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado con 0.01% GelRed (Biotium, USA). La homología de la secuencia amplificada con el correspondiente fragmento del gen *vacA* de *H. pylori* fue determinado por secuenciación, utilizando el método de Sanger (Macrogen, Korea). Las secuencias fueron comparadas por alineamiento del gen *vacA* de *H. pylori* usando

el software BLASTn del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).



**Figura 15.** Grafica de detección y cuantificación de *H. pylori* por qPCR. (A) Curva que muestra el pico de temperatura de fusión ( $T_m$ ) para el fragmento del gen *vacA* amplificado. (B) Curva de amplificación del gen *vacA*.

Se realizaron los análisis de las muestras de agua cruda y potable para determinar la cantidad de ADN de *H. pylori* presente en las mismas. Además, se calculó el número más probable de unidades genómicas de acuerdo con la cantidad de ADN medido, según Linke *et al.* (2010): el peso del genoma de *H. pylori* (1667.867

pb) se calculó con el peso medio de pares de bases (1.096 E21 g/pb) para determinar el número probable de genomas de *H. pylori* dentro de la cantidad medida del ADN.

$$\text{Unidades genómicas (UG)} = \frac{\text{Concentración de ADN (fg)}}{\text{Masa genómica}^a}$$

<sup>a</sup> En el caso de *H. pylori* para el gen *vacA*, este valor equivale a 1.76 fg

#### 4.5.2.5. Detección e identificación de *H. pylori* mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

El uso de FISH es una técnica alternativa para la detección de *H. pylori* en muestras de agua. Las muestras que se analizaron por FISH fueron las que resultaron positivas por cultivo. Como control positivo de los análisis se utilizó la cepa de referencia NCTC 11637 y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.

Para la detección de *H. pylori* se utilizó la sonda LNA-HPY diseñada por Moreno *et al.* (2003a), complementaria a una región específica de 16S ARNr, sintetizada por EXIQON (Exiqon A/S Vedvaek, Dinamarca) y marcada Cyanine 3 (CY3), que emite fluorescencia en el espectro del rojo (580 nm). En todas las hibridaciones se empleó una combinación de tres sondas complementarias a una región del ARNr 16S del dominio Eubacteria (EUB338) como control positivo (Tabla 8). Estas sondas hibridan con todas las bacterias que pueden estar presentes en la muestra (Amann *et al.*, 1990).

**Tabla 8.** Secuencia de las sondas LNA-HPY y EUB338.

Nomenclatura sondas	Secuencia de nucleótidos
LNA-HPY	5'-CTG GAG AGA C + TA AGC CC + T CC- 3'
EUB338-I	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3'
EUB338-II	5'- GCA GCC ACC CGT AGG TGT - 3'
EUB338-III	5'- GCT GCC ACC CGT AGG TGT - 3'

Las sondas EUB388 fueron sintetizadas y marcadas por TIB MOLBIOL (Berlin, Alemania), con 5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster (FLUOS) que emite fluorescencia en el espectro del verde (495 nm).

Para la detección e identificación de *H. pylori* por FISH se realizó el protocolo establecido por Moreno *et al.* (2003a), que se describe a continuación:

#### 4.5.2.5.1. Fijación de las muestras

Para llevar a cabo la fijación de las células se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L del sedimento resuspendido en PBS 1X y se centrifugó 8 min a 8000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en 1mL de solución de PBS 1X a la que se adicionó paraformaldehído al 4% en proporción 1:3 (Anexo II.2). Esta solución se mantuvo durante 3 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 8000 rpm durante 8 min, el sobrenadante se descartó y el sedimento fue resuspendido nuevamente en 1mL de PBS 1X.

El procedimiento de lavado se repitió tres veces. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en 1ml de la solución de PBS 1X/etanol absoluto 1:1 (v/v). Las muestras ya fijadas fueron almacenadas a -20°C hasta la hibridación.

#### 4.5.2.5.2. Hibridación *In situ*

Una alícuota de 10 $\mu$ L de cada muestra fijada se depositó en el pocillo de un portaobjetos de diagnóstico previamente preparado con gelatina (Anexo II.2). A continuación, el portaobjetos se dejó secar al aire, y se procedió a realizar 3 deshidrataciones sucesivas, sumergiendo el portaobjetos en volúmenes de 100 mL de etanol a concentraciones 50, 80 y 100%, durante 3 minutos cada una.

Una vez secos los portaobjetos, a cada uno de los pocillos se le adicionó 10  $\mu$ L de tampón de hibridación (0.9M NaCl, 0.01% SDS, 20nM Tris-HCl, 35% Formamida, pH 7.6) (Anexo II.2) conteniendo 50 ng de sonda marcada con el correspondiente fluorocromo.

La reacción de hibridación se llevó a cabo a 46°C en condiciones de oscuridad según Moreno *et al.* (2003). El portaobjetos se introdujo en posición horizontal en un tubo de 50 mL, en el que se introdujo previamente una base de papel de celulosa humedecida con el mismo tampón de hibridación. El tiempo de hibridación fue de 90 minutos.

Una vez finalizada la hibridación, se procedió al lavado del portaobjetos 2 veces con 1mL de solución de lavado (20nM Tris-HCl, 0.01% SDS, 80mM NaCl, 5mM EDTA) (Anexo II.2) atemperado a 48°C. A continuación, el portaobjetos se dejó sumergido en 50 mL de la solución de lavado para eliminar el resto de sonda que no se hubiera unido al ARNr. El tiempo de lavado fue de 15 minutos, manteniéndose a 48°C en oscuridad. A la solución de lavado se le añadió 700 µL de NaCl (0.5M) condicionada por el porcentaje de formamida utilizada en la hibridación (Anexo II.2).

Tras los 15 minutos del lavado, los portaobjetos se lavaron con agua ultrapura y se secaron al aire en oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 gota de medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Mounting médium for fluorescence, H-100, VECTOR) entre el cubre y el portaobjetos, para reducir la pérdida de fluorescencia de las sondas cuando se está realizando la observación microscópica.

Por último, se realizó la visualización mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara Olympus DP-12 (Olympus, Alemania).

#### **4.6. ANÁLISIS DE INDICADORES BACTERIANOS DE ORIGEN FECAL EN AGUAS**

Tanto en aguas potables como crudas, durante el estudio se cuantificaron los niveles de coliformes totales y *E. coli*, los cuales son exigidos por la normatividad colombiana como indicadores de la calidad del agua para consumo humano (Resolución 2115 de 2007 y Decreto 1594 de 1984).

#### 4.6.1. Técnica de filtración por membrana para la cuantificación de coliformes totales y *E. coli* en aguas potables y crudas - ISO 9308-1 (2014)

El recuento de coliformes totales y *E. coli* en aguas se realizó según el protocolo ISO 9308-1 (2014). Para el agua cruda se realizaron diluciones seriadas de la muestra (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ), se tomaron 1mL de cada dilución y se filtró; para el agua potable se filtró un volumen de 100mL de la muestra directamente.

Las muestras se filtraron utilizando membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ; una vez realizado el proceso de filtración las membranas se colocaron sobre agar Chromocult coliformes (Merck, Alemania) con suplemento selectivo para *E. coli*/coliformes y fueron incubadas durante 21 ( $\pm 3$ ) h a 36°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Las colonias azul oscuro/púrpura se identificaron como *E. coli*; las colonias rojas se identificaron como coliformes totales. Como control positivo se utilizó *E. coli* ATCC 25922 y control negativo, *Salmonella entérica subsp.* Entérica serovar Entiritidis ATCC 13076.

#### 4.6.2. Técnica de filtración por membrana para la cuantificación de esporas de *Clostridium* sulfito reductor en aguas potables y crudas - ISO 6461-2 (1986)

Para la detección y cuantificación de esporas de *Clostridium* sulfito reductor se utilizó el método de filtración por membrana ISO 6461-2(1986). Las muestras tanto de agua potable como cruda fueron incubadas a 75°C durante 15 minutos, con el fin de pasar de la forma vegetativa de la bacteria a la forma esporulada. Para el agua cruda se realizaron diluciones seriadas de la muestra (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ), se tomó 1mL de cada dilución y de la muestra sin diluir y se filtró; para el agua potable se filtró un volumen de 100mL de la muestra directamente.

Las muestras se filtraron utilizando membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,22 $\mu\text{m}$ ; una vez realizado el proceso de filtración las membranas se colocaron sobre agar SPS (Merck, Alemania) y se adicionó a cada una de las placas de 2 a 5 mL de agar SPS, a una temperatura entre 45 a 60°C, cubriendo toda la

membrana con el fin de asegurar la anaerobiosis. Las placas se colocaron en jarra de anaerobiosis con un sobre de anaeroGen (AnaeroGen™, Oxoid) y se incubaron durante 44 ( $\pm 4$ ) h a 37 °C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Las colonias de color negro se reportaron como esporas de *Clostridium* sulfito reductor. Como control positivo se utilizó *Clostridium* spp. CMPUJ 262 y control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 4.7. Análisis de parámetros fisicoquímicos en aguas

Los análisis fisicoquímicos fueron realizados usando los protocolos del manual Standard Methods (APHA, 2012) que se referencian en la Tabla 9. Los datos de estos análisis fueron suministrados por las plantas de tratamiento de agua potable en estudio.

**Tabla 9.** Parámetros fisicoquímicos analizados en el estudio.

Parámetro	Unidades	Técnica
<b>Turbiedad</b>	UNT	Nefelométrico SM 2130-B
<b>Conductividad</b>	$\mu\text{S/cm}$	Electrométrico SM 2510-B
<b>pH</b>	NA	Electrométrico SM 4500-H-B
<b>Cloro residual libre</b>	mg/L $\text{Cl}_2$	Colorimétrico DPD SM 4500- CL- F

UNT: Unidades de turbidez;  $\mu\text{S/cm}$ : microSiemens / centímetro; NA: No aplica; mg/L  $\text{Cl}_2$ : miligramos de Cloro / Litro

#### 4.8. Análisis estadístico

Para determinar el número de muestras (**n**) se aplicó una “estadística descriptiva”, teniendo en cuenta el histórico de 4 años de parámetros físico-químicos (pH, conductividad y turbidez) y microbiológicos (coliformes totales) de cada planta de potabilización en estudio (PTAP 1, 2 y 3). Para el análisis estadístico, se trabajó con una confianza del 90% y se determinó que, para tener un grupo de datos estadísticamente representativos, se evaluarían un total de 318 muestras, siendo 159 muestras de agua cruda y 159 de agua potable ( $p < 0,05$ ,  $\alpha = 0,10$ ). El programa estadístico utilizado fue SPSS vr. 22.

Para determinar si existe correlación entre la concentración de los indicadores de contaminación fecal (coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor) y la presencia y/o ausencia de *H. pylori* en el agua cruda y potable, se realizó un análisis estadístico bivariado (software “IBM SPSS Statistics 24”) utilizando el coeficiente de correlación de Spearman,  $\rho$  (rho), teniendo en cuenta el criterio  $\rho > 0,95$  y  $\Delta \rho < 0,001$ . Este coeficiente es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas.

De igual forma, para determinar si existe correlación entre las variaciones de los parámetros fisicoquímicos analizados (pH, conductividad, turbidez y cloro residual libre) y la presencia y/o ausencia de *H. pylori* en el agua cruda y potable, se realizó un análisis bivariado (software “IBM SPSS Statistics 24”), utilizando el coeficiente de correlación de Spearman,  $\rho$  (rho).

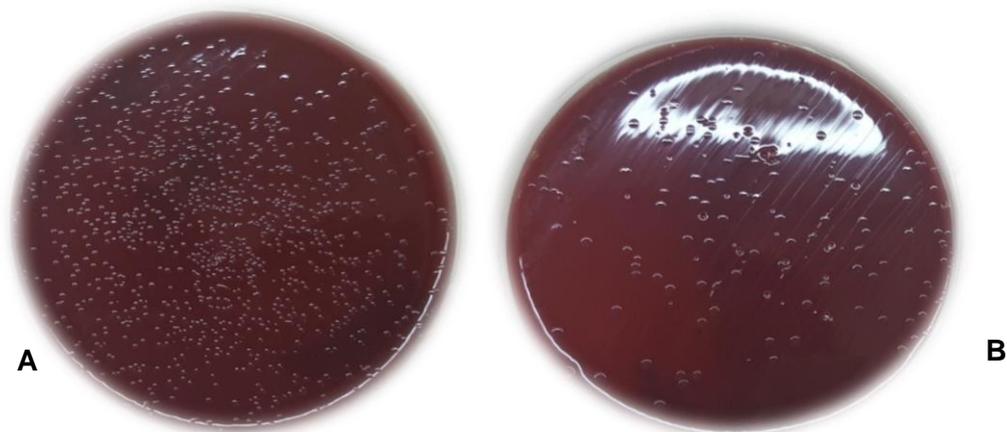
La interpretación de coeficiente de Spearman, oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente. Cero significa no correlación, pero no independencia. El hecho que exista correlación entre las variables no implica que exista causalidad o independencia entre ellas. Las diferencias en los valores de los datos se consideraron significativas a  $p < 0,05$ .

En todos los análisis realizados se utilizó como variable independiente la presencia de *H. pylori* y como variables dependientes los indicadores bacterianos de contaminación fecal, coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor, así como los parámetros físico-químicos: pH, turbidez, conductividad y cloro residual libre

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *Helicobacter pylori* A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA

Tras la evaluación de los 3 medios de cultivo específicos para la detección y aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de agua, se observó crecimiento de *H. pylori* en los medios de cultivo Agar Brucella suplementado (ABS) ( $\bar{x}$ =  $5.8 \times 10^5$  ufc/mL) y Agar HP ( $\bar{x}$ =  $3.8 \times 10^3$  ufc/mL). En el caso del Agar HP suplementado con antibióticos no se observó crecimiento a ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 16).

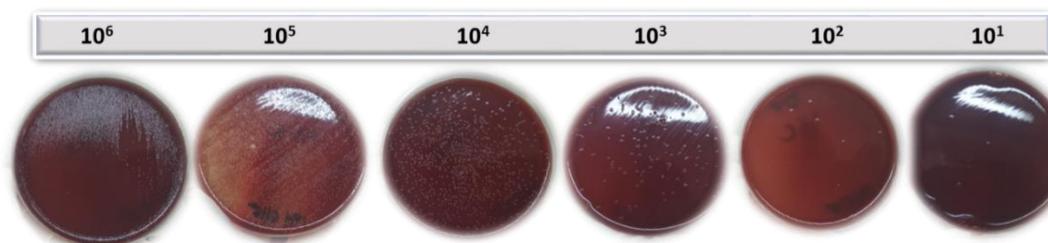


**Figura 16.** Crecimiento de colonias de *H. pylori* NCTC 11637 en Agar Brucella Suplementado. **A.** *H. pylori* NCTC 11637 a concentración  $10^6$  ufc/mL. **B.** *H. pylori* NCTC 11637 a concentración  $10^3$  ufc/mL.

Los resultados obtenidos tras el recuento de colonias sobre la superficie de los medios de cultivo evaluados mostraron que en el Agar ABS se recuperaron 2 unidades logarítmicas más que en las placas con Agar HP. Por esta razón todos los cultivos para el aislamiento y detección de *H. pylori* a partir de las muestras de agua se realizaron en el Agar ABS.

El filtro de membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  generó los mejores resultados de recuperación de *H. pylori* y el tiempo de incubación de las muestras óptimo fue de 10 días a  $37^\circ\text{C}$  en condiciones de microaerofilia (5%  $\text{O}_2$ , 11%  $\text{CO}_2$ , 85%  $\text{N}_2$ ).

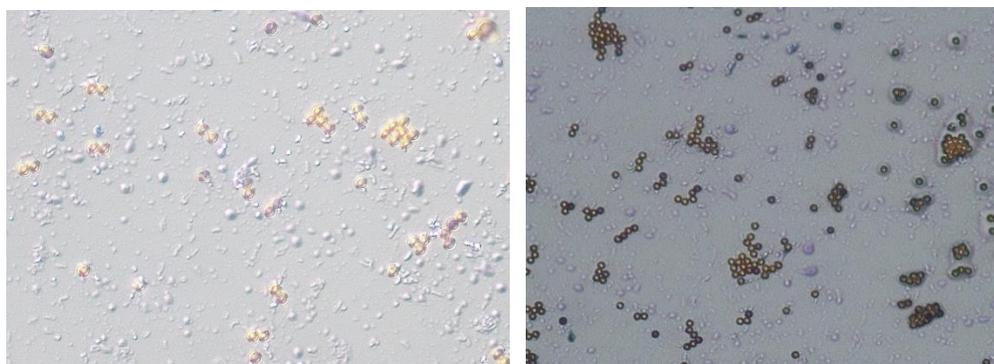
Una vez seleccionado el medio de cultivo a utilizar y las membranas de filtración, se determinó el límite de detección del medio de cultivo ABS, en  $3.0 \times 10^1$  ufc/mL (Figura 17).



**Figura 17.** Límite de detección de *H. pylori* NCTC 11637 sobre Agar Brucella Suplementado.

#### 5.1.1. Detección e identificación de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda por cultivo

El ensayo realizado para determinar la unión de las perlas sensibilizadas con las células de *H. pylori* NCTC 11637, mostró que las perlas se unían tanto a las formas cocoides como bacilares de la bacteria (Figura 18).

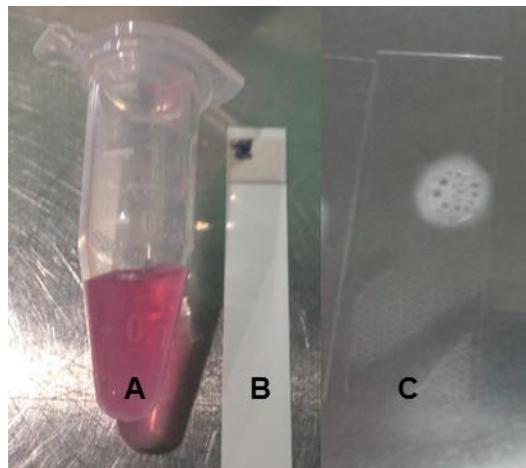


**Figura 18.** Unión de células bacilares y cocoides de *H. pylori* NCTC 11637 con las perlas inmunomagnéticas.

En la Tabla 10, se recogen los resultados obtenidos a partir de las tres metodologías de cultivo propuestas en este estudio, para la detección de *H. pylori* en agua cruda: siembra directa de la suspensión de la muestra a partir de la

centrifugación, siembra del concentrado de la muestra mediante la técnica de separación inmunomagnética (SIM) y siembra de la muestra después del preenriquecimiento e incubación en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 24 horas.

Se obtuvieron 136 cultivos mixtos (los cuales correspondían a 94 de 155 muestras) con alta presencia de microbiota acompañante y colonias presuntivas para *H. pylori*. Al no obtener colonias aisladas de *H. pylori*, se tomó parte del crecimiento microbiano presente en las placas y se realizó confirmación preliminar mediante coloración de Gram y 3 pruebas bioquímicas: ureasa, catalasa y oxidasa; las cuales fueron positivas, por tanto, estos resultados fueron presuntivos para la presencia de *H. pylori* (Figura 19).



**Figura 19.** Pruebas bioquímicas de ureasa (A), catalasa (B) y oxidasa (C) para confirmación presuntiva de *H. pylori* por cultivo en muestras de agua cruda.

En 5 muestras se observaron posibles colonias presuntivas de *H. pylori* por las 3 estrategias de cultivo evaluadas. Así mismo, se observaron colonias presuntivas de *H. pylori* en 32 muestras por 2 de las 3 estrategias evaluadas (Figura 20).



**Figura 20.** Crecimiento microbiano en agar Brucella suplementado en cultivo mixto con presencia de colonias presuntivas de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda.

La estrategia de separación inmunomagnética (SIM, estrategia 2) presentó resultados similares en las 3 PTAP, con resultados positivos entre 25%-28.3%, siendo esta la estrategia con menor porcentaje de muestras positivas. De igual forma, la estrategia de siembra a partir del preenriquecimiento de la muestra (estrategia 3) mostro resultados similares en las 3 PTAP, con porcentajes entre 26%-31%. En cuanto a la estrategia de cultivo de siembra directa a partir de la concentración de la muestra por centrifugación (estrategia 1), en las PTAP 2 y 3 arrojó el mayor porcentaje de muestras positivas (36.5% y 40% respectivamente), mientras que en la PTAP 1 fue la estrategia con menor número de muestras positivas (22.6%).

**Tabla 10.** Detección presuntiva de *H. pylori* mediante las tres estrategias de cultivo para muestras de agua cruda.

Planta	Estrategia 1 (Siembra Directa)	Estrategia 2 (SIM)	Estrategia 3 (Enriquecimiento)
PTAP 1	22.6 % (12/53)	28.3% (15/53)	26,4% (14/53)
PTAP 2	36.5% (19/52)	25% (13/52)	30,8% (16/52)
PTAP 3	40% (20/50)	26% (13/50)	28% (14/50)
<b>Total</b>	<b>32.9% (51/155)</b>	<b>26.4% (41/155)</b>	<b>28.4% (44/155)</b>

### 5.1.1.1. Puesta a punto de la PCR convencional para la detección y genotipificación de *H. pylori*

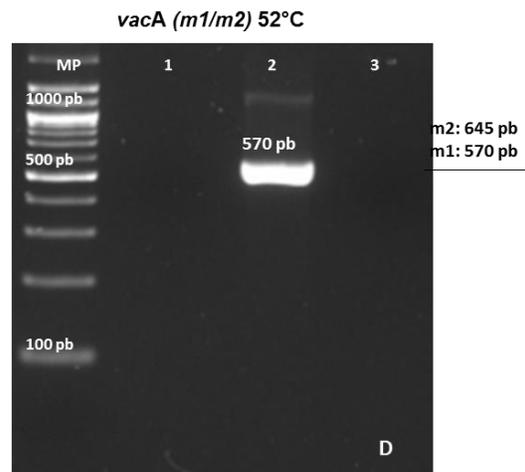
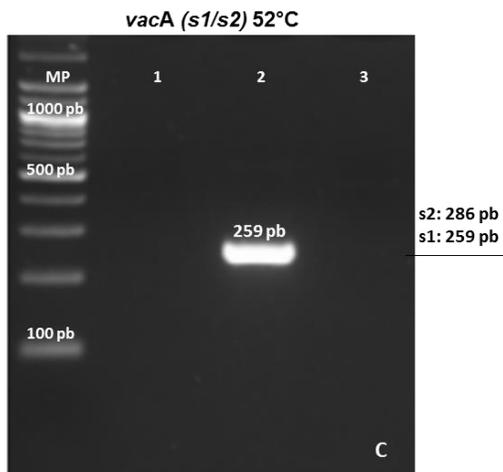
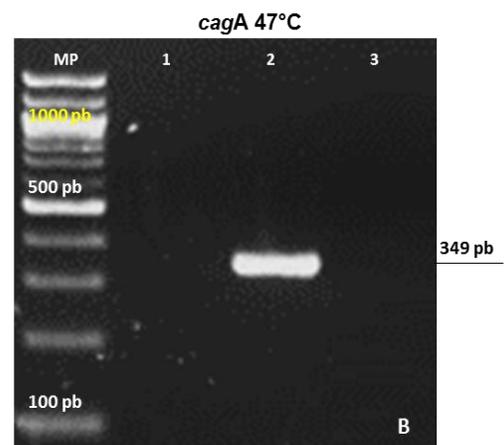
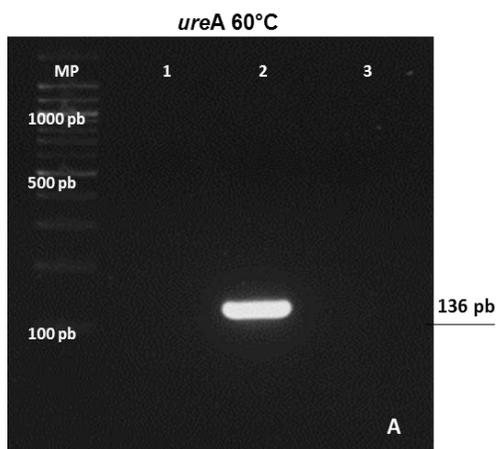
Para la identificación y genotipificación de *H. pylori* por PCR convencional se utilizaron los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (formas alélicas *s1/s2* y *m1/m2*) y *glmM*.

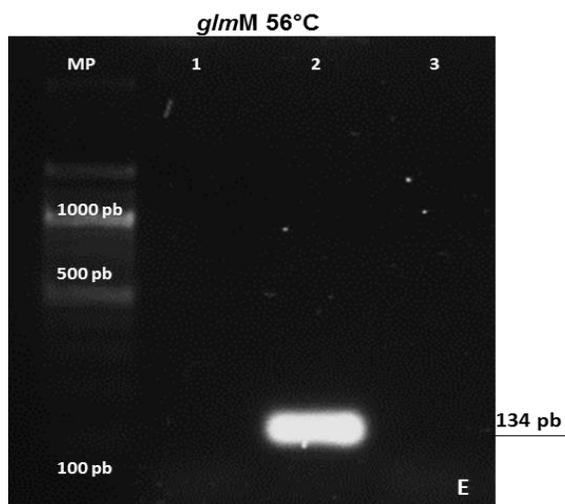
Tras los diversos ensayos de puesta a punto, las concentraciones óptimas fueron: 0.3  $\mu$ M de iniciadores, 1  $\mu$ L de ADN por muestra y 10  $\mu$ L de volumen final de reacción (Tabla 11 y Figura 21).

**Tabla 11.** Condiciones óptimas de la PCR para amplificación de los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (*s1/s2* y *m1/m2*) y *glmM* de *H. pylori*.

Gen	Nombre Programa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)
<b><i>ureA</i></b>	Desnaturalización	1	94	02:00
	Desnaturalización	40	94	00:30
	Unión de iniciadores		60	00:20
	Extensión del producto		72	00:30
	Extensión final	1	72	05:00
	Enfriamiento	1	10	Continuo
<b><i>cagA</i></b>	Desnaturalización	1	95	00:02
	Desnaturalización	40	95	01:00
	Unión de iniciadores		47	01:00
	Extensión del producto		74	01:00
	Extensión final	1	72	05:00
	Enfriamiento	1	10	Continuo
<b><i>vacA</i> (<i>s1/s2</i>)</b> <b><i>vacA</i> (<i>m1/m2</i>)</b>	Desnaturalización	1	95	00:02
	Desnaturalización	35	95	01:00
	Unión de iniciadores		52	01:00
	Extensión del producto		72	01:00
	Extensión final	1	72	05:00
	Enfriamiento	1	10	Continuo

<b>glmM</b>	Desnaturalización	1	95	00:02
	Desnaturalización	35	94	00:50
	Unión de iniciadores		56	00:50
	Extensión del producto		72	01:00
	Extensión final	1	72	05:00
	Enfriamiento	1	10	Continuo





**Figura 21.** Estandarización de las temperaturas de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR de los genes en estudio de *H. pylori*. **A.** gen *ureA*. **B.** gen *cagA*. **C.** gen *vacA* (*s1/s2*). **D.** gen *vacA* (*m1/m2*). **E.** gen *glmM*. MP: marcador de peso molecular; 1. Control negativo; 2. *H. pylori* NCTC 11637; 3. *E. coli* ATCC 25922.

#### 5.1.1.2. Identificación genotípica de los cultivos presentes en el agua cruda

Para la identificación y genotipificación de *H. pylori* por PCR convencional se utilizaron los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (formas alélicas *s1/s2* y *m1/m2*) y *glmM*. Para cada reacción se utilizaron 10  $\mu$ L como volumen final, con una concentración de iniciadores de 0.3  $\mu$ M, 1  $\mu$ L de ADN y 1U de master mix Taq polimerasa (Promega).

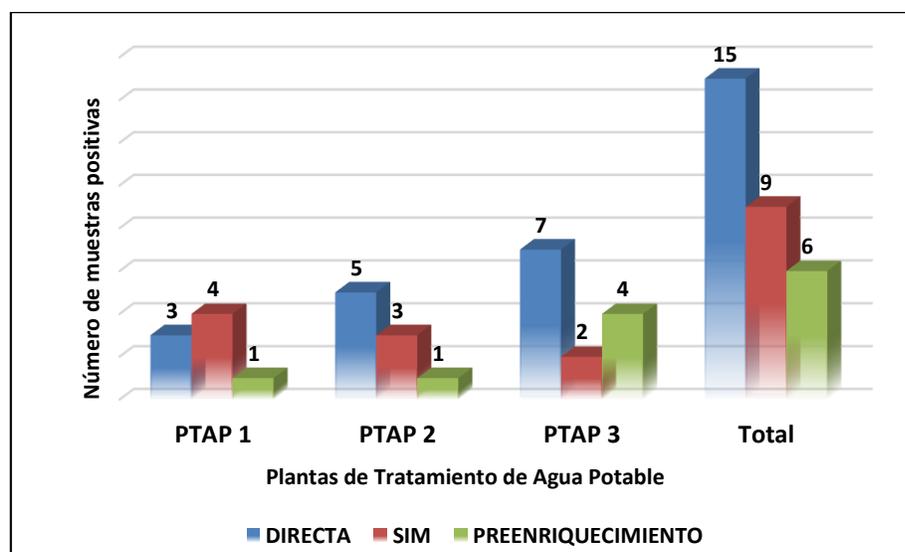
**PCR.** Se analizaron por PCR los 136 cultivos mixtos con colonias presuntivas para *H. pylori*, correspondientes a 94 de las 155 muestras de agua cruda. Sólo en el 33.5% (52/155) de las muestras se pudo amplificar al menos 2 de los genes en estudio.

**qPCR.** De igual forma, los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori*, fueron analizados por qPCR mediante la amplificación de un fragmento del gen *vacA*. Mediante esta técnica, se identificaron aislamientos procedentes de las diferentes estrategias de cultivo evaluadas. (Tablas 13, 14 y 15).

Para confirmar los resultados obtenidos mediante PCR a partir de los cultivos mixtos, se secuenciaron los fragmentos amplificados del gen *vacA* (Tablas 12, 13, 14 y 15). Los resultados de las secuencias amplificadas se verificaron con las secuencias contenidas en las bases de datos del GenBank mediante el programa BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El fragmento amplificado a partir de 26 cultivos de las 155 (16.8%) muestras (Tablas 13, 14 y 15) presentaba una homología del 98-100% con el gen *vacA* de *H. pylori* (GenBank números de acceso: AF049653.1 – CP003904.1AJ438914.1 – U95971.1).

La PTAP 3 fue la que presentó el mayor número de muestras positivas, con un 24% (12/50), seguido por la PTAP 2 con 15.4% (8/52). La planta que presentó el menor número de muestras positivas por cultivo fue la PTAP 1, con 11.3% (6/53) (Tabla 12).

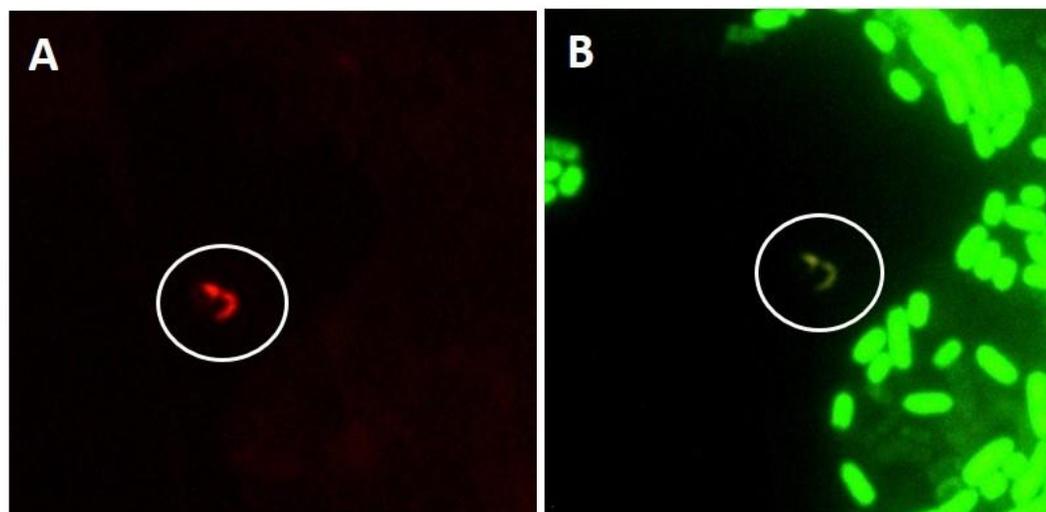
En la PTAP 1, la estrategia de siembra a partir de la concentración de la muestra por SIM (estrategia 2) fue la que presentó el mayor número de muestras positivas. En las PTAP 2 y 3 la estrategia más efectiva fue la de siembra directa a partir de la suspensión obtenida por la centrifugación de las muestras (estrategia 1) (Figura 22).



**Figura 22.** Muestras de agua cruda positivas para *H. pylori* por las estrategias de cultivo evaluadas en las plantas de tratamiento.

**FISH.** Se procedió a la identificación de *H. pylori* a partir de los 26 cultivos mixtos que incluían las colonias características y que habían sido confirmados por secuenciación del gen *vacA*. Para ello se fijaron y se hibridaron con la sonda HPYL-LNA. Tras la observación al microscopio de epifluorescencia se confirmó que los 26 cultivos obtenidos mediante las 3 estrategias de cultivo contenían células de *H. pylori*, tanto en forma bacilar como cocoide (Figura 23), lo que confirmó de nuevo que las colonias características presentes en los cultivos, a pesar de no poderse purificar, pertenecían a *H. pylori* (Tablas 13, 14 y 15).

En la Figura 23(A) se observa la hibridación de las células de *H. pylori* con la sonda HPYL-LNA, y en la 23(B) la hibridación de las células con las sondas EUB 338.



**Figura 23.** Identificación por FISH de *H. pylori* en la muestra de agua cruda N° 17 de la PTAP 2, siembra directa a partir de la suspensión después de la centrifugación. (A) Hibridación con la sonda HPYL-LNA. (B) Hibridación con las sondas EUB 338 (Publicado en: Vesga *et al.*, 2018).

**Tabla 12.** Detección e identificación de *H. pylori* en el agua cruda en las tres plantas de potabilización por el método de cultivo.

Método de Confirmación	PTAP 1	PTAP 2	PTAP 3
Pruebas bioquímicas	49.1% (26/53)	69.2% (36/52)	64% (32/50)
PCR genotipos	20.7% (11/53)	34.6% (18/52)	28% (14/50)
qPCR gen <i>vacA</i>	11.3% (6/53)	15.4% (8/52)	24% (12/50)
FISH	11.3% (6/53)	15.4% (8/52)	24% (12/50)
PCR gen <i>vacA</i>	17% (9/53)	17.3% (9/52)	24% (12/50)
Homología del gen <i>vacA</i>	<b>11.3%</b> (6/53)	<b>15.4%</b> (8/52)	<b>24%</b> (12/50)

**Tabla 13.** Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori* en agua cruda en la PTAP 1.

Muestra	Colonias	Bioquímicas	PCR	FISH	qPCR gen <i>vacA</i>	PCR gen <i>vacA</i>	Homología gen <i>vacA</i>	Genotipos
CT3	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CT4	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT11	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT18	Habc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>bc</sup>	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CT20	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT21	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>b</sup>	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CT22	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CT23	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT24	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> - <i>vacAs1/m1</i>
CT25	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT26	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CT27	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT28	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT30	Habc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	Positivo <sup>c</sup>	(-)	NA
CT31	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT33	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	Positivo	(-)	NA
CT34	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	Positivo <sup>ab</sup>	(-)	NA
CT35	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT37	Habc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT39	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT42	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT44	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

## 5. Resultados

---

CT45	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT46	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT47	Hbc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CT51	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

Nomenclatura de los cultivos: H: *Helicobacter pylori*; a: siembra directa; b: siembra a partir de SIM; c: siembra después de preenriquecimiento; (-): negativo para *H. pylori*; NA: no aplica.

**Tabla 14.** Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori* en agua cruda en la PTAP 2.

Muestra	Colonias	Bioquímicas	PCR	FISH	qPCR gen <i>vacA</i>	PCR gen <i>vacA</i>	Homología gen <i>vacA</i>	Genotipos
CD3	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	96%	<i>cagA-,vacAs1</i>
CD4	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD5	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD6	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	96%	<i>cagA-,vacAs1/m1</i>
CD7	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA-,vacAs1/m1</i>
CD8	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD12	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD13	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD16	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA-,vacAs1</i>
CD17	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>a</sup>	99%	<i>cagA-,vacAs1/m1</i>
CD18	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD19	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD20	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD21	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA-,vacAs1/m1</i>
CD22	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>b</sup>	99%	<i>cagA-,vacAs1/m1</i>
CD23	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD25	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD26	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD27	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD28	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD30	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD32	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

## 5. Resultados

CD33	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD34	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	Positivo <sup>a</sup>	(-)	NA
CD36	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD37	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD39	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD43	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD44	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD46	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD47	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD49	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD50	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD51	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD52	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CD53	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>a</sup>	98%	<i>cagA+vacAs1</i>

Nomenclatura de los cultivos: H: *Helicobacter pylori*; a: siembra directa; b: siembra a partir de SIM; c: siembra después de preenriquecimiento; (-): negativo para *H. pylori*; NA: no aplica.

**Tabla 15.** Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori* en agua cruda en la PTAP 3.

Muestra	Colonias	Bioquímicas	PCR	FISH	qPCR gen <i>vacA</i>	PCR gen <i>vacA</i>	Homología gen <i>vacA</i>	Genotipos
CW3	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW4	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW5	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW6	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW7	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	97%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m2</i>
CW9	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW10	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	97%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1</i>
CW11	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW12	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW14	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW16	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW19	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW20	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW21	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW22	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>c</sup>	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW23	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW24	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW26	Habc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>ab</sup>	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
CW27	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW28	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW31	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW33	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

## 5. Resultados

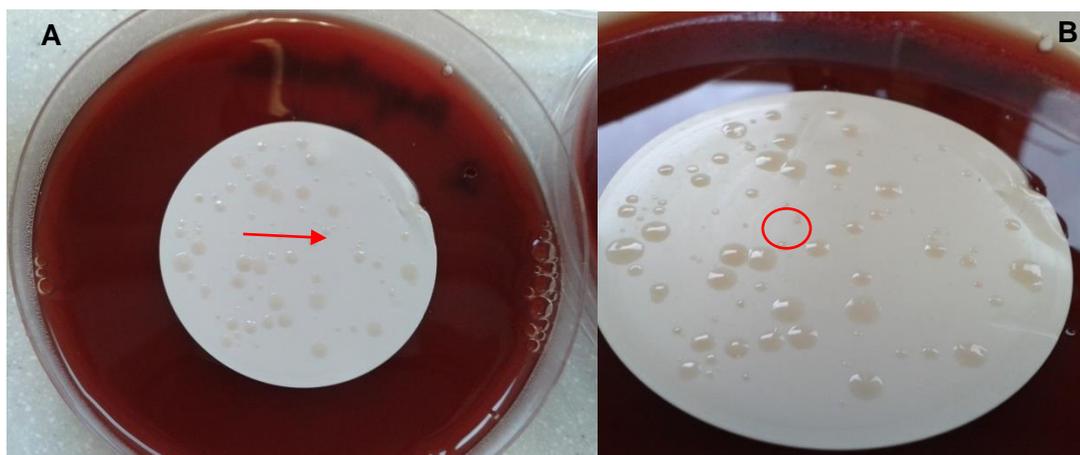
---

CW34	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW35	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW36	Habc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW39	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW42	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW45	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs2/m1</i>
CW46	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW49	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
CW50	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1</i>
CW51	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

Nomenclatura de los cultivos: H: *Helicobacter pylori*; a: siembra directa; b: siembra a partir de SIM; c: siembra después de preenriquecimiento; (-): negativo para *H. pylori*; NA: no aplica.

### 5.1.2. Detección e identificación de *H. pylori* a partir de muestras de agua potable por cultivo

Para la identificación por cultivo de *H. pylori* a partir de aguas potables, también se utilizaron 3 estrategias diferentes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la identificación por coloración de Gram y pruebas bioquímicas, encontramos un total de 137 cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori*, que correspondían a 101 del total de las 155 muestras de agua potable analizadas. Al igual que en el agua cruda, en el agua potable tampoco se logró el aislamiento de colonias de *H. pylori*, solo la presencia de colonias presuntivas en cultivos mixtos. En 4 muestras se observaron colonias presuntivas de *H. pylori* por las 3 estrategias de cultivo evaluadas. Así mismo, se observaron colonias presuntivas de *H. pylori* en 27 muestras por 2 de las 3 estrategias evaluadas (Figura 24).



**Figura 24.** Crecimiento bacteriano en agar Brucella suplementado a partir de muestras de agua potable por filtración por membrana tras enriquecimiento. Cultivo mixto con colonias presuntivas de *H. pylori* (A). Detalle de las colonias (B).

Como se observa en la Tabla 16, el método de filtración por membrana (estrategia 1) fue el que proporcionó mayor porcentaje de muestras positivas en las 3 plantas de tratamiento. En cuanto a la siembra realizada a partir de la SIM (estrategia 3) y la siembra después del preenriquecimiento (estrategia 2) mostraron los mismos resultados en las PTAP 1 y 2 o (26.4% y 21.1% respectivamente). En la PTAP 3 la

estrategia de cultivo a partir de SIM (estrategia 3) fue la que dio el menor número de muestras positivas (16%).

**Tabla 16.** Detección presuntiva de *H. pylori* mediante las tres estrategias de cultivo para muestras de agua potable.

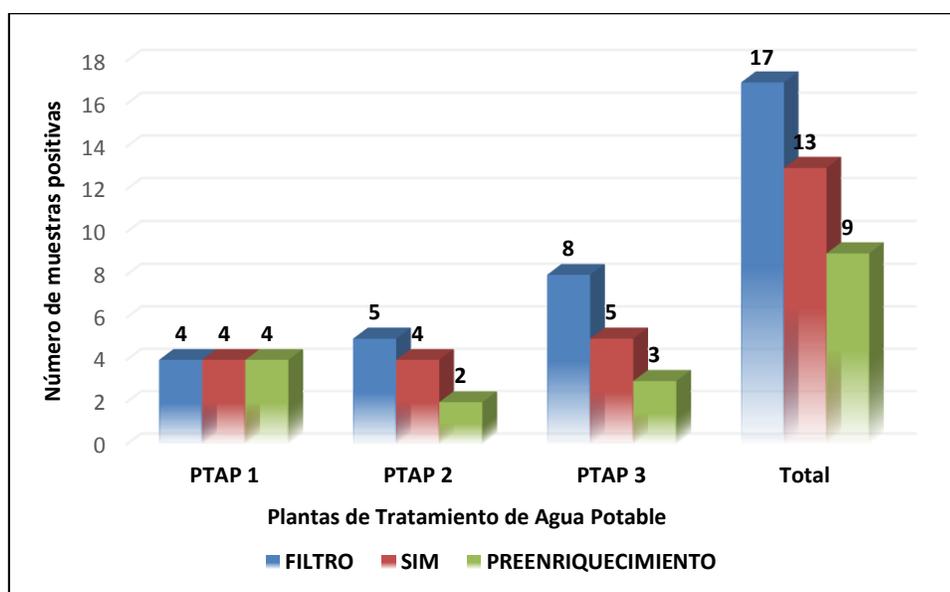
Planta	Estrategia 1 (Filtración por membrana)	Estrategia 2 (Siembra después de Preenriquecimiento)	Estrategia 3 (SIM)
PTAP 1	41.6% (22/53)	26.4% (14/53)	26.4% (14/53)
PTAP 2	38.5% (20/52)	21.2% (11/52)	21.2% (11/52)
PTAP 3	54% (27/50)	20% (10/50)	16% (8/50)
<b>TOTAL</b>	<b>44.5% (69/155)</b>	<b>22.6% (35/155)</b>	<b>21.3% (33/155)</b>

#### 5.1.2.1. Identificación genotípica de los cultivos presentes en el agua potable

**PCR.** Se analizaron por PCR los 137 cultivos presuntivos para *H. pylori*, realizando la amplificación de los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (formas alélicas *m1/m2* y *s1/s2*) y *glmM*. Sólo en el 32.3% (50/155) de las muestras se obtuvo amplificación de al menos 2 de los genes en estudio.

**qPCR.** Los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori*, fueron analizados por qPCR para la detección de un fragmento del gen *vacA*, identificándose aislamientos procedentes de las diferentes estrategias de cultivo evaluadas. (Tablas 18, 19 y 20). Del mismo modo que en el caso de las aguas crudas, para confirmar los resultados obtenidos mediante PCR se secuenciaron los fragmentos amplificados del gen *vacA* (Tablas 17, 18, 19 y 20). Los resultados verificaron que en los cultivos del 19.4% (30/155) de las muestras (Tablas 18, 19 y 20) las secuencias amplificadas presentaban una homología del 98-100% con el gen *vacA* de *H. pylori* (GenBank números de acceso: AF049653.1 – CP003904.1AJ438914.1 – U95971.1).

La PTAP 3 fue la que presentó el mayor número de muestras positivas, con un 24% (12/50), seguido por la PTAP 1 con 18.9% (10/53). La planta que presentó el menor número de muestras positivas por cultivo fue la PTAP 2 con 15.4% (8/52) (Tabla 17). En la Figura 25, se muestra el número de muestras positivas por las 3 estrategias de cultivo evaluadas en las plantas de tratamiento. Observamos que en la PTAP 1 con las 3 estrategias evaluadas se obtuvo el mismo número de muestras positivas. En cuanto a las plantas PTAP 2 y 3 la estrategia más efectiva fue la de filtración por membrana (estrategia 1) seguida por la de SIM (estrategia 2).



**Figura 25.** Muestras de agua potable positivas para *H. pylori* por las estrategias de cultivo evaluadas en las plantas de tratamiento.

**FISH.** Se procedió a la identificación de *H. pylori* a partir de los 30 cultivos mixtos que incluían las colonias presuntivas de *H. pylori* y que habían sido confirmados por secuenciación del gen *vacA*. Tras la observación al microscopio de epifluorescencia se confirmó que los 30 cultivos mixtos obtenidos mediante las 3 estrategias de cultivo contenían células de *H. pylori*, tanto en forma bacilar como cocoide, por lo que se confirmó que las colonias presuntivas presentes en los cultivos mixtos, a pesar de no poderse purificar, pertenecían a *H. pylori* (Tablas 18, 19 y 20).

**Tabla 17.** Detección e identificación de *H. pylori* en el agua potable en las tres plantas de potabilización por el método de cultivo.

Método de Confirmación	PTAP 1	PTAP 2	PTAP 3
Pruebas bioquímicas	64.2% (34/53)	61.5% (32/52)	64% (32/50)
PCR genotipos	24.5% (13/53)	28.8% (15/52)	44% (22/50)
qPCR gen <i>vacA</i>	18.9% (10/53)	15.4% (8/52)	24% (12/50)
FISH	18.9% (10/53)	15.4% (8/52)	24% (12/50)
PCR gen <i>vacA</i>	20.8% (11/53)	17.3% (9/52)	24% (12/50)
Homología del gen <i>vacA</i>	18.9% (10/53)	15.4% (8/52)	24% (12/50)

**Tabla 18.** Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori* en agua potable en la PTAP 1.

Muestra	Colonias	Bioquímicas	PCR	FISH	qPCR gen <i>vacA</i>	PCR gen <i>vacA</i>	Homología gen <i>vacA</i>	Genotipo
PT1	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT3	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT6	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT10	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT11	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT12	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT13	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT14	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT15	Hbc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>b</sup>	99%	, <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT16	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT17	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT18	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT20	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT21	Hbc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>c</sup>	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT22	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAm1</i>
PT23	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT24	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT25	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT26	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>
PT27	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT28	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT30	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	Positivo <sup>a</sup>	(-)	NA

PT31	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT32	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT33	Habc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT34	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT35	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT41	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT42	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT43	Habc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>c</sup>	99%	<i>cagA</i> -, <i>vacAs2/m2</i>
PT44	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT45	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT48	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PT51	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

Nomenclatura de los cultivos: H: *Helicobacter pylori*; a: filtración por membrana (tamaño de poro 0,22µm); b: siembra a partir de SIM; c: siembra después de preenriquecimiento; (-): negativo para *H. pylori*; NA: no aplica.

**Tabla 19.** Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori* en agua potable en la PTAP 2.

Muestra	Colonias	Bioquímicas	PCR	FISH	qPCR gen <i>vacA</i>	PCR gen <i>vacA</i>	Homología gen <i>vacA</i>	Genotipo
PD2	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD3	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD4	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	97%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD5	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD7	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD8	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD12	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD13	Hab	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD14	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA+</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD15	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD16	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD18	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>ab</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD23	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>a</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD24	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>b</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PD25	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD27	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD28	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD29	Habc	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>abc</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs2/m1</i>
PD30	Hbc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD31	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD32	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD33	Hbc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	Positivo <sup>c</sup>	(-)	NA
PD37	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

PD39	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD40	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD41	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD44	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD45	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD47	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD48	Hbc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD52	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PD53	Hc	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

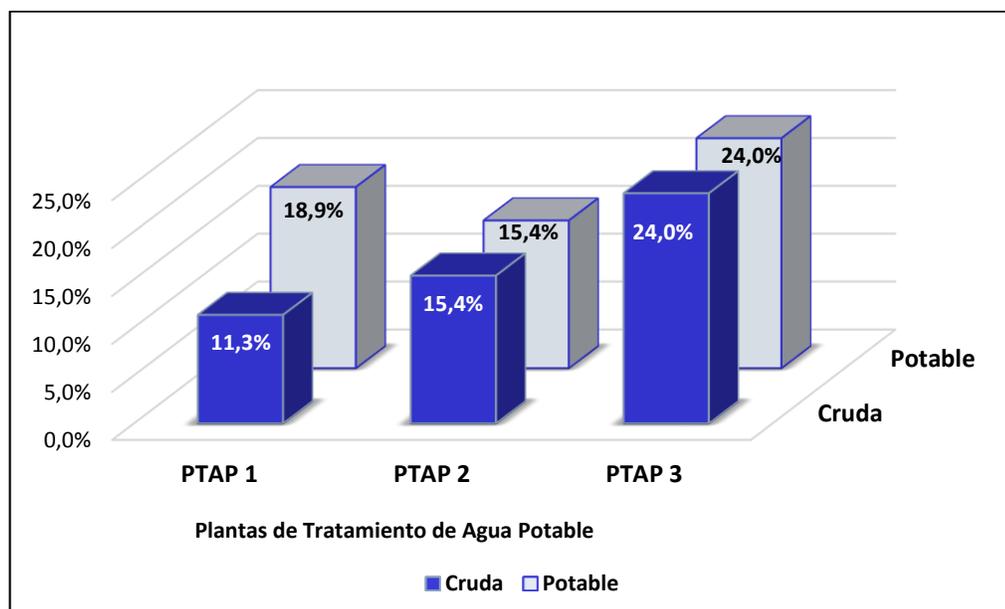
Nomenclatura de los cultivos: H: *Helicobacter pylori*; a: filtración por membrana (tamaño de poro 0,22µm); b: siembra a partir de SIM; c: siembra después de preenriquecimiento; (-): negativo para *H. pylori*; NA: no aplica.

**Tabla 20.** Identificación de los cultivos mixtos con colonias presuntivas de *H. pylori* en agua potable en la PTAP 3.

Muestra	Colonias	Bioquímicas	PCR	FISH	qPCR gen <i>vacA</i>	PCR gen <i>vacA</i>	Homología gen <i>vacA</i>	Genotipo
PW1	Hbc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW2	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW3	Hb	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW4	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	, <i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW6	Hc	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW9	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW11	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW12	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW13	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW14	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA+</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW15	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW16	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW18	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>b</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW20	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW23	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	98%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW24	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW25	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW26	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>ab</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs1/m1</i>
PW27	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW28	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>a</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs2/m1</i>
PW29	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA, glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>a</sup>	99%	<i>cagA-</i> , <i>vacAs2/m1</i>
PW30	Hac	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

PW31	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW32	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW33	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW36	Hab	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW38	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA,glmM</i>	Positivo	Positivo	Positivo <sup>a</sup>	99%	<i>cagA-,vacAs2/m1m2</i>
PW39	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW40	Ha	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW43	Hac	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW44	Ha	Positivo	Positivo <i>ureA</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	NA
PW49	Hb	Positivo	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NA

Nomenclatura de los cultivos: H: *Helicobacter pylori*; a: filtración por membrana (tamaño de poro 0,22µm); b: siembra a partir de SIM; c: siembra después de preenriquecimiento; (-): negativo para *H. pylori*; NA: no aplica.



**Figura 26.** Porcentaje de la presencia e identificación de *H. pylori* por cultivo en aguas crudas y potables en las tres plantas de potabilización.

Por el método de cultivo se ha determinado la presencia de células cultivables de *H. pylori* en aguas crudas y potables. Para la PTAP 1 se obtuvo una mejor recuperación en el agua potable, con un 18,9% (10 muestras) que en el agua cruda, 11,3% (6 muestras). Para la PTAP 2 se pudo cultivar *H. pylori* a partir de 8 muestras (15,4%) en ambos tipos de agua. y en la PTAP 3 encontramos 12 (24%) muestras positivas por cultivo tanto para agua cruda como potable (Figura 26). En 56 de las 310 muestras analizadas se logró el cultivo de *H. pylori*, pero no la obtención de colonias aisladas, por tanto, su confirmación se realizó a través de pruebas moleculares y secuenciación.

## 5.2. Detección e identificación de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda y potable mediante métodos moleculares

### 5.2.1. Detección de *H. pylori* en aguas crudas y potables por PCR convencional

Para realizar la detección de *H. pylori* por PCR convencional, se utilizaron las condiciones previamente estandarizadas y descritas anteriormente (sección 5.1.1.1.).

Mediante amplificación de los genes *ureA*, *cagA*, *vacA* (*s1/s2* y *m1/m2*) y *glmM* de *H. pylori* se obtuvo un total de 60 muestras positivas (60/155, 38,7%).

Para confirmar la presencia de *H. pylori* en todas las muestras en las que las PCR habían resultado positivas, se procedió a la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del gen *vacA*. Los resultados obtenidos confirmaron la detección de *H. pylori* sólo en el 22,6% de las 155 muestras de agua analizadas. Las PTAP 2 y 3 presentaron el mayor porcentaje de detección, 26,9 y 26% respectivamente, mientras que en el agua cruda de la PTAP 1 se detectó *H. pylori* sólo en el 15,1% de las muestras (Tabla 21).

**Tabla 21.** Detección de *H. pylori* en el agua cruda en las tres plantas de potabilización por PCR.

Planta	Muestras amplificadas para los genes de detección*	Muestras amplificadas gen <i>vacA</i>	Muestras confirmados por secuenciación**
PTAP 1	30.2% (16/53)	15,1% (8/53)	15,1% (8/53)
PTAP 2	34.6% (18/52)	32.7% (17/52)	26,9% (14/52)
PTAP 3	52% (26/50)	30% (15/50)	26% (13/50)
<b>Total</b>	<b>38.7% (60/155)</b>	<b>25.8% (40/155)</b>	<b>22.6% (35/155)</b>

\* genes *ureA* y *glmM*; \*\* confirmadas por secuenciación del gen *vacA*.

En cuanto al agua potable, se observó un menor número de falsos positivos al realizar la PCR que en el agua cruda, obteniendo un rango de muestras positivas para la presencia del ADN de *H. pylori* de 38–40%. Una vez confirmadas las muestras por secuenciación del gen *vacA*, encontramos que el rango de detección del ADN de la bacteria en el agua potable de las tres plantas de potabilización fue del 24-29%, siendo la PTAP 2 la que presentó el mayor número de muestras positivas, con un 28.8%. En la PTAP 1 fueron positivas el 28.3% y en la PTAP 3, el 24% (Tabla 22).

**Tabla 22.** Detección de *H. pylori* en el agua potable en las tres plantas de potabilización por PCR.

Planta	Muestras amplificadas para los genes de detección*	Muestras amplificadas gen <i>vacA</i>	Muestras confirmados por secuenciación**
PTAP 1	39.6% (21/53)	28.3% (15/53)	28.3% (15/53)
PTAP 2	38.5% (20/52)	32.7% (17/52)	28.8% (15/52)
PTAP 3	38% (19/50)	24% (12/50)	24% (12/50)
<b>Total</b>	<b>38.7% (60/155)</b>	<b>28.4% (44/155)</b>	<b>27.1% (42/155)</b>

\* genes *ureA* y *glmM*; \*\* confirmadas por secuenciación del gen *vacA*.

Teniendo en cuenta el total de muestras analizadas (155 muestras de cada tipo de agua) encontramos que el porcentaje de detección del ADN de *H. pylori* por el método de PCR fue mayor en el agua potable que en el agua cruda, obteniéndose un 27.1% y 22.6% respectivamente.

### 5.2.2. Caracterización genotípica y secuenciación de *H. pylori* en las tres plantas de potabilización estudiadas.

En las Tablas 23 a 28 se muestran los resultados de la caracterización genotípica y el resultado del porcentaje de identidad (ID) resultante de la secuenciación del amplicon del gen *vacA* presente en las muestras positivas para *H. pylori* tanto en aguas crudas como potables. Las muestras que presentaron una similitud (porcentaje de identidad) con el genoma del gen *vacA* de *H. pylori*  $\geq 97\%$  fueron consideradas como positivas para la detección e identificación de este microorganismo en las muestras de agua. Las secuencias obtenidas se resumen en el anexo VI.

#### 5.2.2.1. Caracterización genotípica de *H. pylori* en la PTAP 1

Muestras analizadas: 53 de Agua Cruda y 53 de Agua Potable

**Tabla 23.** Caracterización genotípica de *H. pylori* presente en el agua cruda de la PTAP 1.

Muestra	Genotipo presente en la muestra	Identidad de la secuencia del gen <i>vacA</i>
4	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1m2</i>	ID= 98%
5	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
8	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
13	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 99%
16	<i>ureA, cagA - , vacAs1/ m1</i>	ID= 98%
21	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/ m1</i>	ID= 99%
24	<i>ureA, cagA - , vacAs1/ m1</i>	ID= 99%
39	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/ m2</i>	ID= 99%

Muestras confirmadas por secuenciación del gen *vacA*: 8 (53) muestras.

**Tabla 24.** Caracterización genotípica de *H. pylori* presente en el agua potable de la PTAP 1.

Muestra	Genotipo presente en la muestra	Identidad de la secuencia del gen <i>vacA</i>
1	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
2	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
3	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
4	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
5	<i>ureA, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
6	<i>ureA, cagA - , vacAs1s2/m1</i>	ID= 97%
7	<i>ureA, cagA - ,vacAs1/m1</i>	ID= 98%
9	<i>ureA, cagA - ,vacAs1/m2</i>	ID= 97%
10	<i>ureA, cagA - ,vacAs1/m1</i>	ID= 97%
11	<i>ureA, glmM, cagA - ,vacAs1/m1</i>	ID= 98%
12	<i>ureA, cagA - ,vacAs1/m1</i>	ID= 98%
13	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 99%
16	<i>ureA, cagA - , vacAs2/m1</i>	ID= 100%
23	<i>ureA, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
24	<i>ureA, glmM, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 99%

Muestras confirmadas por secuenciación del gen *vacA*: 15 (53) muestras.

### 5.2.2.2. Caracterización genotípica de *H. pylori* en la PTAP 2

Muestras analizadas: 52 de Agua Cruda y 52 de Agua Potable.

**Tabla 25.** Caracterización genotípica de *H. pylori* presente en el agua cruda de la PTAP 2.

Muestra	Genotipo presente en la muestra	Identidad de la secuencia del gen <i>vacA</i>
1	<i>ureA, cagA - , vacAm1</i>	ID= 99%
3	<i>ureA, cagA - , vacAs2/m1</i>	ID= 98%
4	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
7	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 99%
8	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
13	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 99%
15	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/ m1</i>	ID= 99%
16	<i>ureA, cagA - , vacAs1s2/m1</i>	ID= 99%
17	<i>ureA, cagA - , vacAs1</i>	ID= 99%
21	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 100%
23	<i>ureA, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 99%
24	<i>ureA, glmM, cagA+, vacAs1/m2</i>	ID= 99%
38	<i>ureA, cagA+, vacAm2</i>	ID= 100%
40	<i>ureA, cagA - , vacAm1</i>	ID= 98%

Muestras confirmadas por secuenciación del gen *vacA*: 14 (52) muestras.

**Tabla 26.** Caracterización genotípica de *H. pylori* presente en el agua potable de la PTAP 2.

Muestra	Genotipo presente en la muestra	Identidad de la secuencia del gen <i>vacA</i>
2	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
3	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
4	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
6	<i>ureA, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
7	<i>ureA, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 98%
9	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 99%
11	<i>ureA, glmM, cagA - , vacAs1/m1</i>	ID= 99%

12	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
13	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 100%
15	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m2</i>	ID= 100%
16	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
17	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 100%
23	<i>ureA, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 99%
24	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 100%
31	<i>ureA, cagA -, vacAm1</i>	ID= 99%

Muestras confirmadas por secuenciación del gen *vacA*: 15 (52) muestras.

### 5.2.2.3. Caracterización genotípica de *H. pylori* en la planta PTAP 3

Muestras analizadas: 50 de Agua Cruda y 50 de Agua Potable.

**Tabla 27.** Caracterización genotípica de *H. pylori* presente en el agua cruda de la PTAP 3.

Muestra	Genotipo presente en la muestra	Identidad de la secuencia del gen <i>vacA</i>
4	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
6	<i>ureA, cagA -, vacAs1</i>	ID= 98%
7	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 99%
8	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m2</i>	ID= 97%
9	<i>ureA, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
10	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
13	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 99%
16	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 98%
18	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs2/m1m2</i>	ID= 100%
21	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 99%
24	<i>ureA, glmM, cagA+, vacAs1/m1</i>	ID= 99%
31	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAm1m2</i>	ID= 97%
38	<i>ureA, glmM, cagA -, vacAs1/m1</i>	ID= 99%

Muestras confirmadas por secuenciación del gen *vacA*: 13 (50) muestras.

**Tabla 28.** Caracterización genotípica de *H. pylori* presente en el agua potable de la PTAP 3.

Muestra	Genotipo presente en la muestra	Identidad de la secuencia del gen <i>vacA</i>
2	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 98%
3	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs2/m1</i>	ID= 98%
4	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 98%
6	<i>ureA</i> , <i>glmM</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m2</i>	ID= 98%
7	<i>ureA</i> , <i>glmM</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 98%
9	<i>ureA</i> , <i>glmM</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 98%
10	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> +, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 98%
11	<i>ureA</i> , <i>glmM</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 99%
16	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1s2/m1</i>	ID= 99%
25	<i>ureA</i> , <i>glmM</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1/m1</i>	ID= 99%
26	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAs1</i>	ID= 99%
31	<i>ureA</i> , <i>cagA</i> -, <i>vacAm1</i>	ID= 99%

Muestras confirmadas por secuenciación del gen *vacA*: 12 (50) muestras.

En cuanto a los genes de virulencia de *H. pylori* evaluados, se encontró que el gen *cagA* está presente en el 2.6% (4/155) de las muestras de agua cruda y en el 3.9% (6/155) de las muestras de agua potable analizadas. Del gen *vacA*, la combinación alélica más prevalente fue *vacAs1/m1*, encontrándose en el 15.5% (24/155) de las muestras de agua cruda y en el 20.6% (32/155) de las muestras de agua potable analizadas. El gen *glmM* se detectó en el 11% (17/155) de las muestras de agua cruda y en el 7.7% (12/155) de las muestras de agua potable analizadas.

En el total de las muestras analizadas hemos encontrado que el genotipo *vacAs1/m1* está presente en el 18.1% (56/310) de las muestras analizadas. El gen *cagA* se encontró en el 3.2 % (10/310) de las muestras analizadas. El gen *glmM* en 9.3% (29/310).

En cuanto a la distribución del genotipo *vacAs1/m1* en las 3 plantas, se encontró el mayor porcentaje en el agua potable con respecto al agua cruda. En el agua potable de la PTAP 2 se encontró el mayor porcentaje, 26,9%. En cuanto a la

presencia del gen *cagA*, ha sido más prevalente en el agua potable de la PTAP 1 y el agua cruda de la PTAP 2 con un 5,7% y %,8% respectivamente. En el agua cruda de la PTAP 3 se encontró el mayor porcentaje del gen *glmM* (18%), en los aislamientos de *H. pylori* de la PTAP 2 estuvo presente en el 7,7% de las muestras tanto de agua cruda como potable, y para este gen en el caso de las muestras de agua cruda y potable de la PTAP 3 fue donde se encontró el menor porcentaje, 7,5% y 5,7% respectivamente (Tabla 29).

**Tabla 29.** Genotipo y genes presentes en el agua cruda y potable de las 3 plantas potabilizadoras.

Genotipo / Gen	PTAP 1		PTAP 2		PTAP 3	
	Cruda	Potable	Cruda	Potable	Cruda	Potable
<i>vacAs1/m1</i>	13,2% (7/53)	22,6% (12/53)	13,5% (7/52)	26,9% (14/52)	18% (9/50)	14% (7/50)
<i>cagA+</i>	0%	5,7% (3/53)	5,8% (3/52)	3,8% (2/52)	2% (1/50)	2% (1/50)
<i>glmM</i>	7,5% (4/53)	5,7% (3/53)	7,7% (4/52)	7,7% (4/52)	18% (9/50)	10% (5/50)

### 5.2.3. Detección y cuantificación de *H. pylori* por qPCR

Del total de las 310 muestras analizadas, se detectó ADN de *H. pylori* mediante qPCR en 77 muestras (24.8%).

En el 10.7% (33/310) de las muestras fue posible cuantificar la presencia de *H. pylori*, con valores de concentración entre 5.77 y  $2.12 \times 10^3$  unidades genómicas (UG) reacción y valores de Ct de 25.64 a 34.85 (Figuras 27 y 28). Las demás muestras positivas (44/310, 14.2%) no pudieron ser cuantificadas debido a que el valor del Ct sobrepasaba el umbral de fiabilidad (>35 ciclos). Todos los resultados quedan recogidos en el anexo III.

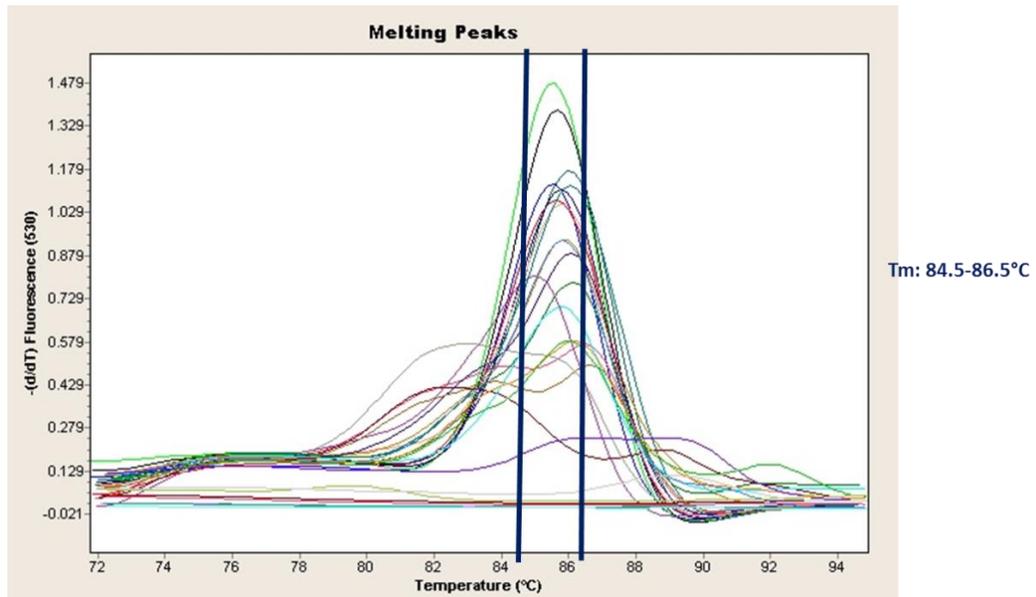


Figura 27. Tm de muestras de agua cruda y potables positivas para el gen *vacA* de *H. pylori*.

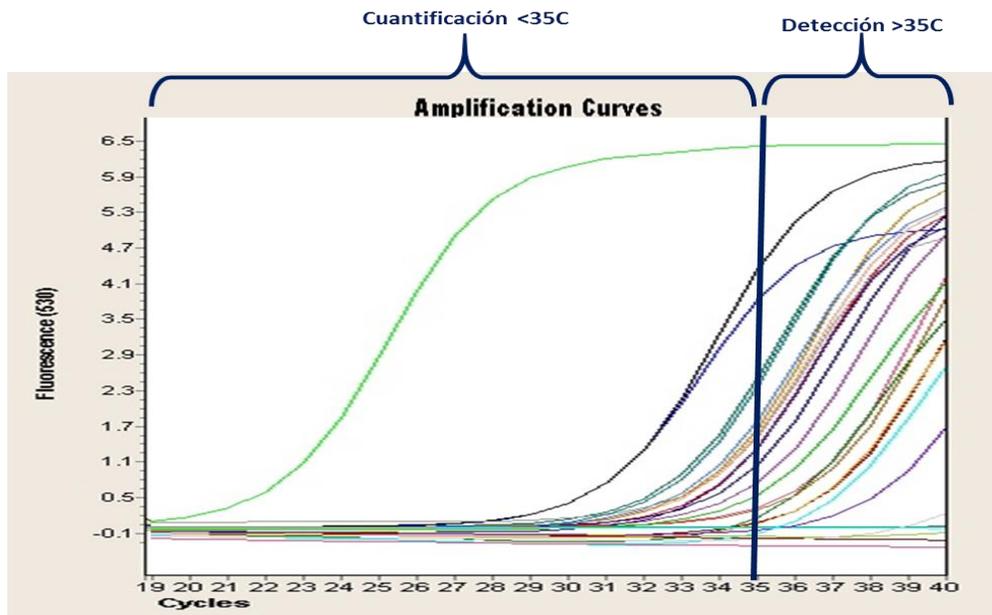


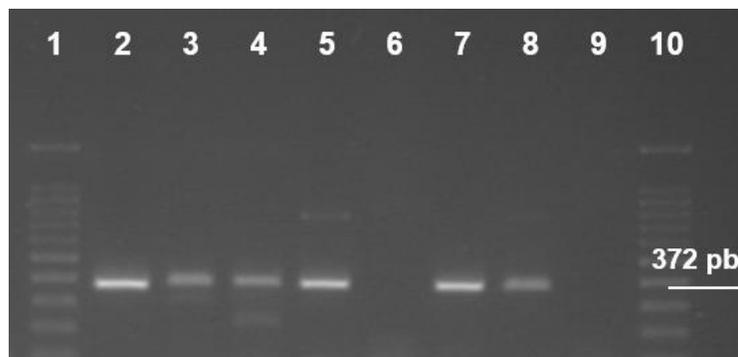
Figura 28. Curvas de amplificación del gen *vacA* de *H. pylori* en muestras de agua.

En el agua cruda de las 3 plantas de tratamiento, el ADN de *H. pylori* fue detectado en un 15-27% de las muestras analizadas, de las cuales fue posible cuantificar 13 (37.1%) muestras positivas. En el agua potable, *H. pylori* fue detectado en 24-29% de las muestras analizadas, pudiéndose cuantificar 20 de las 42 (47.6%) muestras positivas (Tabla 30). Las muestras que dieron positivas, pero en las que la cuantificación no fue posible (Ct >35 ciclos), se verificaron por electroforesis en gel de agarosa, observándose la banda correspondiente al fragmento específico de 372 pb de *H. pylori* (Figura 29). De igual forma, todos los resultados positivos fueron confirmados por secuenciación del gen *vacA*.

El control de la presencia de inhibidores de la Taq-polimerasa en el agua cruda y potable mostró que no había inhibición de la reacción en las muestras. La diferencia entre los Ct de las muestras inoculadas y el control positivo no superó el valor de 1 ciclo, por lo que se detectó la misma cantidad de ADN de *H. pylori* en muestra y control inoculados.

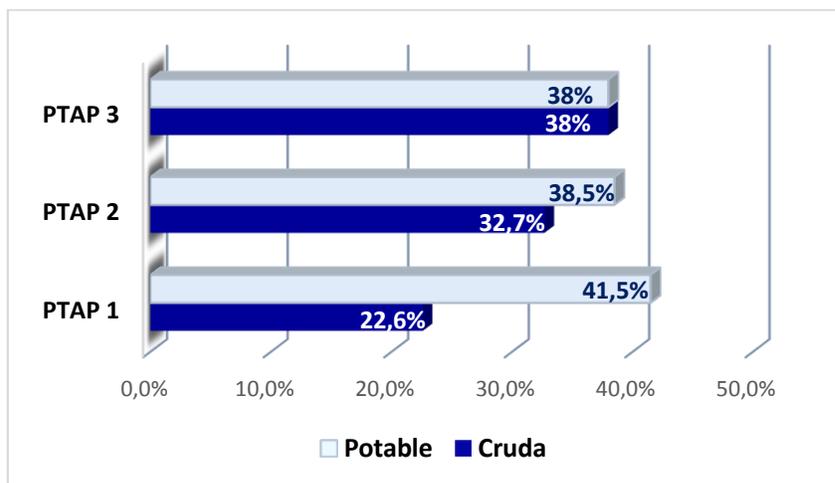
**Tabla 30.** Detección y cuantificación del gen *vacA* de *H. pylori* por qPCR en aguas.

Planta	Agua Cruda		Agua Potable	
	Detectadas	Cuantificadas	Detectadas	Cuantificadas
<b>PTAP 1</b>	15.1% (8/53)	7.6% (4/53)	28.3% (15/53)	11.3% (6/53)
<b>PTAP 2</b>	26.9% (14/52)	5.8% (3/52)	28.8% (15/52)	9.6% (5/52)
<b>PTAP 3</b>	26% (13/50)	12% (6/50)	24% (12/50)	18% (9/50)
<b>Total</b>	<b>22.6% (35/155)</b>	<b>8.4% (13/155)</b>	<b>27.1% (42/155)</b>	<b>12.9% (20/155)</b>



**Figura 29.** Electroforesis que muestra el fragmento específico del gen *vacA* amplificado de *H. pylori* en muestras de agua cruda y potable. Líneas 1 y 10: marcador de 100pb; línea 2: Control positivo *H. pylori* NCTC 11637; líneas 3,5 y 7: muestras de agua potable; líneas 4 y 8: muestras de agua cruda; línea 6: *E. coli* ATCC 25922; línea 9: control negativo.

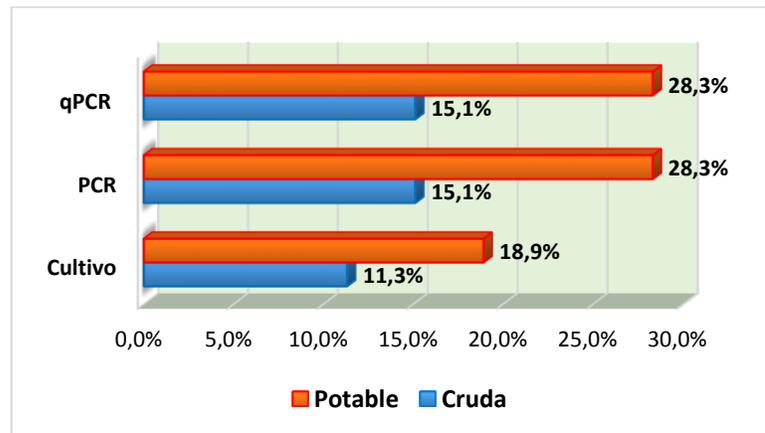
En la Figura 30, se presenta el global de los resultados de la presencia de *H. pylori* en aguas crudas y potables de las 3 PTAP, teniendo en cuenta todos los métodos evaluados.



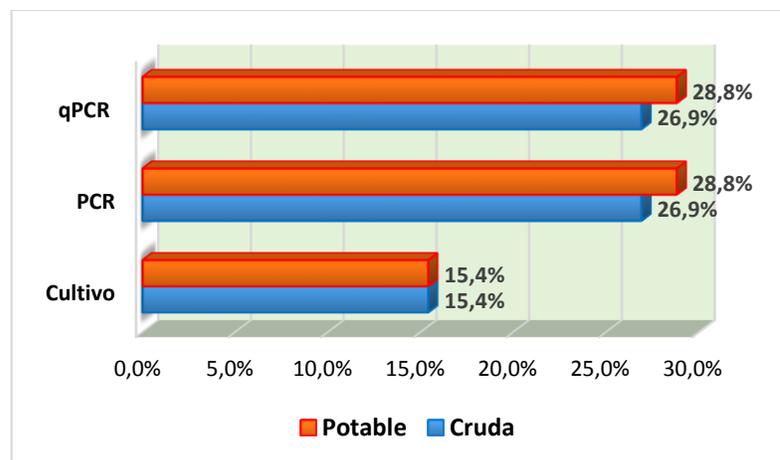
**Figura 30.** Resultados de la detección de *H. pylori* en agua cruda y potable en las tres plantas de tratamiento por las tres técnicas evaluadas.

Cuando se compararon los resultados obtenidos por cultivo y por métodos moleculares, en todos los casos las técnicas de PCR y qPCR fueron las que presentaron el mayor porcentaje de muestras positivas.

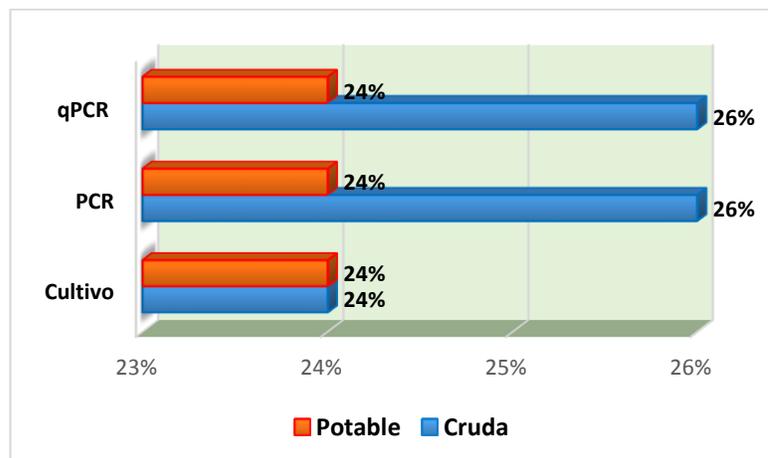
En el agua potable y cruda de la PTAP 1 se obtuvieron valores de 28.3% (15/53) y 15.1% (8/53) para PCR y cultivo, respectivamente. En la PTAP 2, por PCR se detectaron muestras positivas en el 28.8% (15/52) de las muestras de agua potable y el 26.9% (14/52) de las muestras de agua cruda. En el agua cruda de la PTAP 3, por las técnicas de PCR y qPCR se obtuvo un valor de 26% (13/50), mientras que en el agua potable se observó un 24% (12/50) de muestras positivas por las 3 técnicas evaluadas (Figuras 31, 32 y 33).



**Figura 31.** Resultados de la detección de *H. pylori* en agua cruda y potable por las técnicas evaluadas en la PTAP 1.



**Figura 32.** Resultados de la detección de *H. pylori* en agua cruda y potable por las técnicas evaluadas en la PTAP 2.



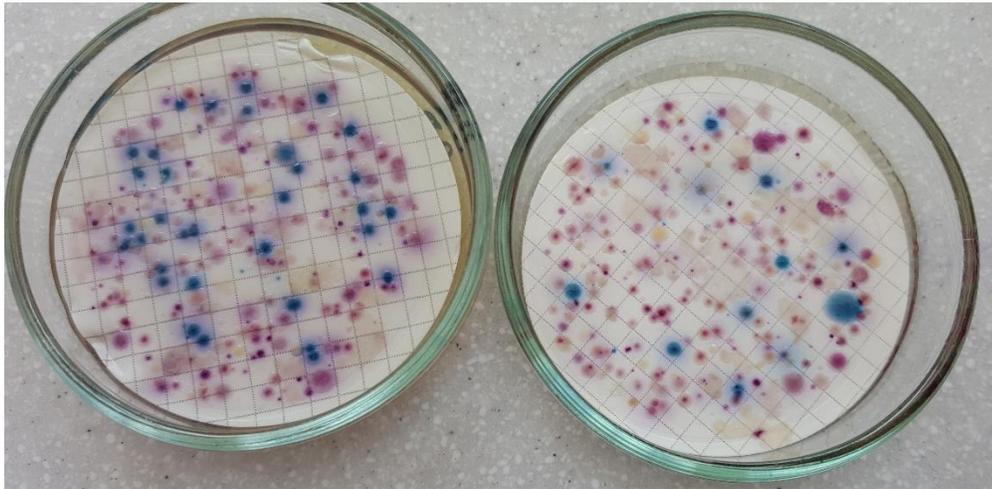
**Figura 33.** Resultados de la detección de *H. pylori* en agua cruda y potable por las técnicas evaluadas en la PTAP 3.

### 5.3. Cuantificación de indicadores bacterianos de origen fecal en aguas crudas y potables

#### 5.3.1. Cuantificación de los Indicadores de contaminación fecal en agua cruda

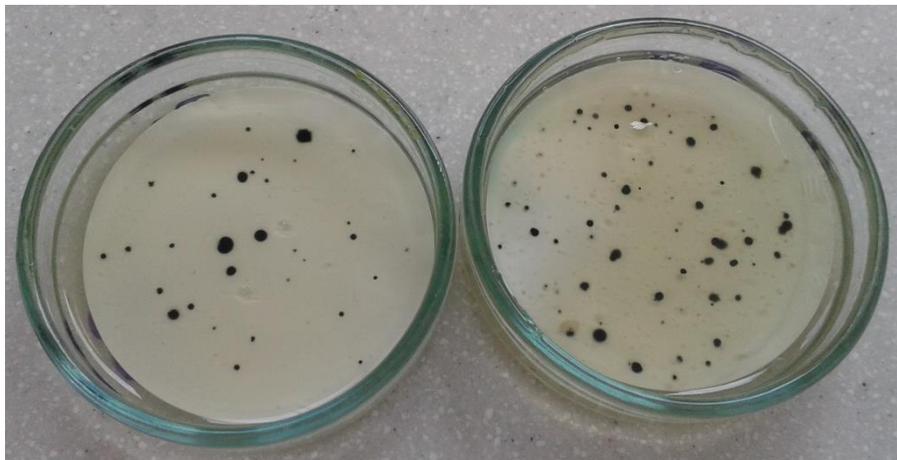
Se evidenció la presencia de coliformes totales en todas (155/155, 100%) las muestras de agua cruda analizadas en las 3 plantas de potabilización, con una concentración promedio de  $8,9 \times 10^3$  ufc/100mL en la PTAP 1,  $5,5 \times 10^2$  ufc/100mL en las PTAP 2 y  $3,8 \times 10^2$  ufc/100mL en la PTAP 3 (Figura 34 y Tabla 31).

*E. coli* se detectó en el 100% de las muestras de agua cruda analizadas procedentes de la PTAP 1, con un promedio de  $8,5 \times 10^2$  ufc/100mL. En la PTAP 2, estaba presente en el 90,4% (47/52) de las muestras analizadas, presentando un promedio de  $6,9 \times 10^1$  ufc/100mL. En la PTAP 3 fue detectado en el 78% (39/50) de las muestras analizadas, con un promedio de  $2,8 \times 10^1$  ufc/100mL (Figura 34 y Tabla 31).



**Figura 34.** Cuantificación de coliformes totales y *E. coli* a partir de agua cruda (PTAP 1) en agar Chromocult Coliformes.

En cuanto a las esporas de *Clostridium* sulfito reductor, en el agua cruda estaban presentes en el 100% de las muestras analizadas para la PTAP 1 (53/53) y la PTAP 2(52/52), con promedios de  $4,2 \times 10^2$  ufc/100mL y  $5,9 \times 10^1$  ufc/100mL, respectivamente. En la PTAP 3 se detectaron en el 96% (48/50) de las muestras analizadas, presentando un promedio de  $1,9 \times 10^1$  ufc/100mL (Figura 35 y Tabla 31).



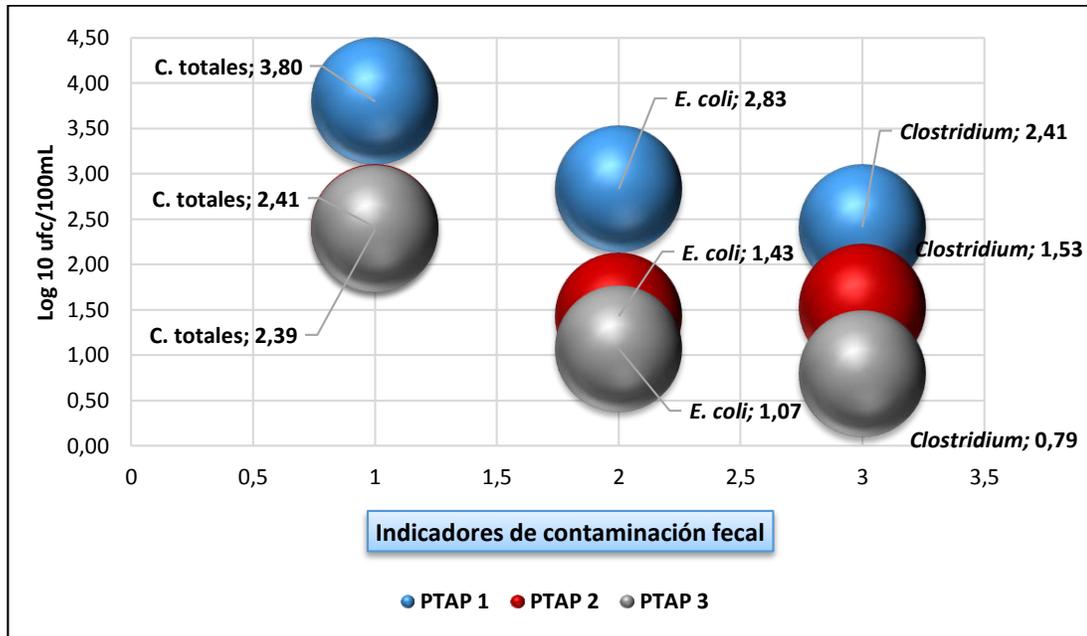
**Figura 35.** Cuantificación de esporas de *Clostridium* sulfito reductor a partir de agua cruda (PTAP 2) en agar SPS.

**Tabla 31.** Cuantificación de coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor en el agua cruda de las tres plantas de tratamiento.

	PTAP 1	PTAP 2	PTAP 3
<b>Coliformes totales (ufc/100mL)</b>			
<b>Promedio</b>	$8,9 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$
<b>Máxima</b>	$5,7 \times 10^4$	$7,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
<b>Mínima</b>	$1,1 \times 10^3$	$3,8 \times 10^1$	$2,4 \times 10^1$
<b>Ds</b>	$\pm 0,33$	$\pm 0,46$	$\pm 0,41$
<b><i>Escherichia coli</i> (ufc/100mL)</b>			
<b>Promedio</b>	$8,5 \times 10^2$	$6,9 \times 10^1$	$2,8 \times 10^1$
<b>Máxima</b>	$3,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
<b>Mínima</b>	$2,0 \times 10^1$	2,0	1,0
<b>Ds</b>	$\pm 0,35$	$\pm 0,67$	$\pm 0,63$
<b>Esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor (ufc/100mL)</b>			
<b>Promedio</b>	$4,2 \times 10^2$	$5,9 \times 10^1$	$1,9 \times 10^1$
<b>Máxima</b>	$5,5 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$
<b>Mínima</b>	$8,0 \times 10^1$	2,0	1,0
<b>Ds</b>	$\pm 0,47$	$\pm 0,49$	$\pm 0,59$

ufc: unidades formadoras de colonia; mL: mililitro; Ds: Desviación estándar

Los tres indicadores mostraron una tendencia similar en las tres plantas de potabilización. Se encontró una mayor concentración del grupo de los coliformes totales en comparación con *E. coli* y las esporas de *Clostridium* sulfito reductor (Figura 36).



**Figura 36.** Concentración promedio de coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor en agua cruda de las plantas de potabilización.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico utilizado para determinar si existía correlación entre la concentración de los indicadores de contaminación fecal (coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor) y la presencia de *H. pylori* en el agua cruda, se encontró que ésta no presenta relación directa con la presencia de ninguno de los indicadores evaluados, encontrando coeficientes de correlación muy bajos para los 3 indicadores:  $\rho=0,041$  para esporas de *Clostridium* sulfito reductor,  $\rho=0,029$  y  $0,017$  para coliformes totales y *E. coli* respectivamente (Tabla 32).

**Tabla 32.** Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor y la presencia de *H. pylori* en agua cruda en las tres plantas de potabilización.

			<b>Coliformes totales</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Esporas de <i>Clostridium</i></b>	<b><i>H. pylori</i></b>
<b>Rho de Spearman</b>	<b>Coliformes totales</b>	Coeficiente de correlación	1,000	0,734**	0,629**	0,029
		Sig. (bilateral)		0,000	0,000	0,716
		N	155	155	155	155
	<b><i>E. coli</i></b>	Coeficiente de correlación	0,734**	1,000	0,729**	0,017
		Sig. (bilateral)	0,000		0,000	0,838
		N	155	155	155	155
	<b>Esporas de <i>Clostridium</i></b>	Coeficiente de correlación	0,629**	0,729**	1,000	0,041
		Sig. (bilateral)	0,000	0,000		0,612
		N	155	155	155	155
	<b><i>H. pylori</i></b>	Coeficiente de correlación	0,029	0,017	0,041	1,000
		Sig. (bilateral)	0,716	0,838	0,612	
		N	155	155	155	155

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

### 5.3.2. Cuantificación de los Indicadores de contaminación fecal en agua potable

Para las tres plantas de potabilización, tanto coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor presentaron concentración de <1 ufc/100mL (Tabla 33).

**Tabla 33.** Cuantificación de coliformes totales, *E. coli* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor en el agua potable de las tres plantas de potabilización.

<b>Planta potabilizadora</b>	<b>Coliformes totales ufc/100 mL</b>	<b><i>E. coli</i> ufc/100 mL</b>	<b>Esporas <i>Clostridium</i> ufc/100 mL</b>
<b>PTAP 1</b>	<1	<1	<1
<b>PTAP 2</b>	<1	<1	<1
<b>PTAP 3</b>	<1	<1	<1

ufc: unidades formadoras de colonias; mL: mililitro; <1: Limite de cuantificación del protocolo.

#### 5.4. Análisis de parámetros fisicoquímicos en aguas crudas y potables

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos evaluados en el agua cruda, en la PTAP 1, se observaron las mayores concentraciones de turbidez y conductividad y valores más altos de pH, con respecto al agua utilizada para potabilizar por las otras 2 PTAP (Tabla 34).

**Tabla 34.** Análisis de turbidez, conductividad y pH en el agua cruda de las tres plantas de tratamiento.

	PTAP 1	PTAP 2	PTAP 3
<b>Turbidez (UNT)</b>			
<b>Promedio</b>	19,4	8,60	3,18
<b>Máxima</b>	36,0	47,1	10,1
<b>Mínima</b>	11,0	3,81	1,48
<b>Ds</b>	± 4,9	±6,69	±1,85
<b>Conductividad (µS/cm)</b>			
<b>Promedio</b>	85,2	20,6	42,8
<b>Máxima</b>	110,0	27,9	94,0
<b>Mínima</b>	60,0	8,1	29,0
<b>Ds</b>	±11,9	±4	±12,5
<b>pH</b>			
<b>Promedio</b>	6,89	6,38	6,81
<b>Máxima</b>	7,20	6,79	7,26
<b>Mínima</b>	6,70	6,12	6,10
<b>Ds</b>	±0,13	±0,14	±0,17

UNT: unidades nefelométricas de turbidez; µS/cm: microSiemens / centímetro; DS: desviación estándar

En la Tabla 35, se muestran los resultados de la concentración de la turbidez, el pH, la conductividad la concentración de cloro residual presentes en el agua de las 3 plantas en estudio.

**Tabla 35.** Análisis de turbidez, conductividad, pH y cloro residual en el agua potable de las tres plantas de tratamiento.

	PTAP 1	PTAP 2	PTAP 3
<b>Turbidez (UNT)</b>			
<b>Promedio</b>	0,14	0,29	0,52
<b>Máxima</b>	0,19	0,82	1,30
<b>Mínima</b>	0,10	0,14	0,28
<b>Ds</b>	± 0,02	±0,14	±0,16
<b>Conductividad (µS/cm)</b>			
<b>Promedio</b>	118,2	66,8	51,1
<b>Máxima</b>	150,0	94,1	78,0
<b>Mínima</b>	80,0	40,6	34,0
<b>Ds</b>	±16,6	±12,3	±12,3
<b>pH</b>			
<b>Promedio</b>	6,79	7,08	6,62
<b>Máxima</b>	6,96	7,95	6,93
<b>Mínima</b>	6,69	6,40	6,39
<b>Ds</b>	±0,06	±0,35	±0,10
<b>Cl<sub>2</sub> Libre (mg/L)</b>			
<b>Promedio</b>	1,74	1,30	1,81
<b>Máxima</b>	1,98	1,91	2,0
<b>Mínima</b>	1,60	0,79	1,53
<b>Ds</b>	±0,10	±0,24	±0,16

UNT: unidades nefelométricas de turbidez; µS/cm: microSiemens / centímetro; Cl<sub>2</sub> Libre: cloro libre residual; mg/L Cl<sub>2</sub>: miligramos de Cloro / Litro; DS: desviación estándar.

Para determinar si existía correlación entre la concentración de la turbidez, el pH y la conductividad y la presencia y/o ausencia de *H. pylori*, tanto en el agua cruda como en el agua potable, se realizó un análisis bivariado, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman,  $\rho$  (rho). El análisis estadístico demuestra que no existe correlación entre las variaciones que puedan presentar las concentraciones de la turbidez, el pH o la conductividad con la presencia y/o ausencia de *H. pylori* en el agua cruda (Tabla 36) ni en la potable (Tabla 37).

**Tabla 36.** Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de los parámetros fisicoquímicos y la presencia de *H. pylori* en agua cruda en las tres plantas de potabilización.

			Turbidez	Conductividad	pH
Rho de Spearman	<i>H. pylori</i>	Coeficiente de correlación	0,040	-0,005	0,056
		Sig. (bilateral)	0,618	0,950	0,491
		N	155	155	155

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

**Tabla 37.** Coeficiente de correlación de Spearman de la concentración de los parámetros fisicoquímicos y la presencia de *H. pylori* en agua potable en las tres plantas de potabilización.

			Turbidez	Conductividad	pH	Cl <sub>2</sub> Residual
Rho de Spearman	<i>H. pylori</i>	Coeficiente de correlación	0,113	-0,057	0,152	-0,155
		Sig. (bilateral)	0,162	0,484	0,060	0,054
		N	155	155	155	155

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

## 6. DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas diversos autores han sugerido que el agua puede ser una ruta importante para la transmisión de *Helicobacter pylori* (Boenhke *et al.*, 2018; Leja *et al.*, 2016; Travis *et al.*, 2010). Sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido completamente demostrada debido a la dificultad que presenta cultivar *H. pylori* a partir de muestras ambientales. Los métodos de cultivo son extremadamente limitados para recuperar *H. pylori* de muestras de agua, principalmente debido a la falta de un medio de cultivo selectivo óptimo (Bahrami *et al.*, 2013; Al-Sulami *et al.*, 2012; Azevedo *et al.*, 2004; Degnan *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2002). De igual forma, el hecho de que otras bacterias presentes en las muestras ambientales puedan crecer en los medios selectivos de *H. pylori* hace que su aislamiento sea un desafío importante. Adicionalmente, *H. pylori* está comúnmente en el estado viable no cultivable (VNC) en las muestras ambientales, lo que hace que su aislamiento sea aún más difícil (Fernández *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2004).

Debido a todos los inconvenientes que presenta el aislamiento y detección de *H. pylori* por cultivo se han buscado métodos que sean más eficaces para la detección del patógeno en aguas. De esta forma, se han desarrollado diversas técnicas moleculares que han permitido no sólo la detección de *H. pylori*, sino también su enumeración, caracterización, determinación de la actividad metabólica y la funcionalidad de algunos genes. Entre las técnicas moleculares de mayor aplicación están las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (qPCR) y la Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), las cuales son técnicas muy específicas y rápidas en la detección de *H. pylori* a partir de muestras ambientales (Cunachi *et al.*, 2015; Flores-Encarnación *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2015; Benson *et al.*, 2004).

Además de la presencia en varias fuentes de agua, se ha demostrado que *H. pylori* tiene largos periodos de supervivencia en ambientes acuáticos y biopelículas (Percival y Suleman, 2014; Azevedo *et al.*, 2008; Gião *et al.*, 2008). Shahamat *et al.* (1993) utilizaron técnicas autorradiográficas para evaluar la actividad metabólica de células de *H. pylori* suspendidas en agua de río esterilizada y agua destilada. Los resultados mostraron que a bajas temperaturas (4°C) las células de *H. pylori* permanecieron viables y cultivables en el laboratorio por hasta 20-25 días. A

temperaturas más altas, la capacidad de cultivarlo se perdió en uno o dos días (Shahamat *et al.*, 1993).

La asociación de *H. pylori* con las comunidades presentes en las biopelículas dentro de un sistema de distribución de agua potable podría ofrecer a la bacteria protección frente a los sistemas de desinfección del agua y a la depredación por protozoos (Percival y Suleman, 2014; Gião *et al.*, 2010). De igual forma, se ha demostrado que *H. pylori* presenta mayor resistencia a la desinfección por cloro y ozono que otros indicadores de contaminación fecal como *E. coli* (Gião *et al.*, 2010). Por tanto, aguas consideradas potables o aptas para consumo humano a nivel legislativo podrían contar con la presencia del patógeno. De hecho, varios estudios han demostrado que *H. pylori* tiene la capacidad de persistir durante periodos de tiempo largos en sistemas de distribución de agua para consumo humano con bajos niveles de cloro residual (0.5 y 1.1 mg/L) (Santiago *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 1997). Estudios previos indican que esta bacteria pierde su capacidad de cultivo en contacto con cloro durante periodos de tiempo cortos (1-5 min), aunque permanece en estado VNC (Moreno *et al.*, 2007).

En la actualidad, más del 50% de la población mundial está infectada con *H. pylori*. Se han destacado varios factores de riesgo relacionados con las condiciones socioeconómicas e higiénico sanitarias de las poblaciones, incluyendo: practicas inadecuadas de higiene durante la infancia, hacinamiento familiar, ausencia de agua potable, ausencia de instalaciones para la recogida y tratamiento de aguas residuales y el manejo inapropiado de alimentos (Vale y Vitor, 2010; Nouraie *et al.*, 2009). La tasa de infección en los países en vía de desarrollo varía entre 80 y 90%, mientras que esta tasa disminuye a un rango entre 30 y 50% en los países desarrollados. La prevalencia de infección en niños presenta una gran variabilidad, con tasas entre 60 y 70% en países de Asia, África y América Latina y menos de 10% en países desarrollados de Europa (Carter *et al.*, 2012; Travis *et al.*, 2010). En los países latinoamericanos llega a 90%; en Colombia la prevalencia de la infección es alta, siendo en la población mayor de 20 años del 86% y en niños cercana a 75% (Moncayo *et al.*, 2006).

En Colombia hay muy pocos estudios que demuestren la presencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos. Goodman *et al.* (1996), en su estudio en Aldana (Nariño), concluyeron que las tasas de infección por *H. pylori* eran más altas en grupos de niños que utilizaban los arroyos sin tratamiento como fuente de agua de consumo. Cuervo *et al.* (2017) evaluaron 194 muestras de agua potable y biopelículas tomadas en instituciones educativas de la ciudad de Medellín (Antioquia), encontrando que la frecuencia de ADN de *H. pylori* fue del 2.1% y la detección por cultivo fue de 11.3%, tanto en agua como en biopelículas.

El Instituto Nacional de Salud (INS) es la institución colombiana encargada de realizar la evaluación anual de la calidad del agua para consumo humano que recibe la población del país. Según la legislación colombiana, en el Decreto 1594 de 1984 (Ministerio de Medio Ambiente, 1984) se establecen las características fisicoquímicas y microbiológicas que debe cumplir el agua que va a ser usada para potabilización. Este Decreto hace referencia a la evaluación de los coliformes totales en las aguas superficiales que entren a un tratamiento de potabilización convencional. Para el agua apta para consumo humano se cuenta con las directrices de la Resolución 2115 de 2007 (Ministerio de Salud, 2007). Para esto se han estipulado 5 niveles de riesgo basados en los resultados del análisis de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos (coliformes totales y *E. coli*). En el informe presentado por el INS en el año 2015 se reportó que solamente el 10% de la población colombiana recibe agua sin riesgo, el 26.6% en nivel riesgo bajo, el 46.7% en nivel de riesgo medio y el 16.7% en niveles riesgo alto para los parámetros establecidos en la Resolución 2115 de 2007 (INS, 2015).

Una planta de tratamiento de agua potable es una secuencia de operaciones o procesos unitarios, cuyo fin es eliminar totalmente cualquier contaminante que pueda afectar la salud humana. El tratamiento convencional implica los siguientes procesos: coagulación y floculación, sedimentación, filtración y desinfección. La desinfección elimina o inactiva microorganismos causantes de enfermedades. Frente a la dificultad del análisis de los patógenos en agua la alternativa es usar microorganismos indicadores de contaminación fecal como: coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*, que son sencillos, fáciles y económicos de identificar

(Formaselect, 2007; Hill, 2006). En el caso de *H. pylori* en sistemas convencionales de tratamiento, en la actualidad no se cuenta con información previa, siendo por tanto fundamental a estudiar qué pasa cuando se captan aguas contaminadas para potabilizar y si el análisis de coliformes totales y *E. coli* son indicadores de la presencia de *H. pylori*.

Hasta la fecha no existe un método estándar para detectar *H. pylori* en muestras ambientales. El uso de métodos no estandarizados complica las comparaciones entre los estudios. Además, la precisión de los resultados varía de acuerdo con la sensibilidad y especificidad de los métodos de detección empleados.

Tomando como base lo anteriormente descrito, este trabajo se centró en la detección e identificación de células viables de *H. pylori* en agua en la ciudad de Bogotá (Colombia). Concretamente, se buscó su presencia en 2 tipos de matrices acuáticas: agua cruda (agua de entrada a las plantas de tratamiento para potabilizar) y agua potable (agua después del tratamiento de potabilización). Debido a la complejidad de las muestras y a la falta de un protocolo estandarizado para la detección de *H. pylori*, las aguas se analizaron mediante cuatro técnicas, con el fin de obtener la máxima eficacia en la detección. Se utilizó el método tradicional de cultivo en placa y tres técnicas moleculares, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR), la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (q-PCR) y la técnica de Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH).

Este estudio tiene como finalidad esclarecer la posible transmisión de *H. pylori* mediante el agua y su potencial resistencia a los sistemas de desinfección utilizados en el tratamiento del agua potable. El estudio de la presencia de *H. pylori* en el agua cruda queda justificado, ya que una de las plausibles vías de trasmisión del patógeno es fecal-oral (Aziz *et al.*, 2015; Goh *et al.*, 2011). En el caso de agua potable, es de suma importancia la determinación de la presencia de *H. pylori* en la misma, ya que esta podría ser fuente de contaminación directa por ingestión continuada. Del mismo modo, el estudio de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal tanto en agua cruda como potable, permite evaluar la eficacia del sistema de tratamiento

en la eliminación de bacterias indicadoras y su relación con la presencia o eliminación de patógenos como *H. pylori* y así mismo, determinar la resistencia de *H. pylori* a los desinfectantes comúnmente usados para el tratamiento del agua potable.

Dada la dificultad en el cultivo de *H. pylori* a partir de muestras ambientales, diversos autores han intentado mejorar los medios de cultivo y permitir un mejor aislamiento de la bacteria, sobre todo en muestras muy contaminadas, como es el caso de aguas o alimentos (Chomvarin *et al.*, 2017; Ranjbar *et al.*, 2016; Moreno y Ferrús, 2012; Fernández *et al.*, 2006). A pesar de todas las modificaciones realizadas durante los últimos años en los medios de cultivo, en la actualidad no existe ningún medio óptimo para el aislamiento de *H. pylori* en muestras ambientales, ya que la microbiota acompañante enmascara la presencia de colonias características del patógeno.

En este trabajo se evaluaron tres diferentes medios de cultivo para el aislamiento de *H. pylori*, a partir de diferentes bases: Agar Brucella BBL™ suplementado con 5% de sangre de caballo desfibrinada, 0,2% de DENT y 0,4% de Isovitalax (Navarro *et al.*, 2007), Agar HP (Degnan *et al.*, 2003) y Agar HP suplementado con ácido nalidíxico, sulfato de estreptomina y kanamicina, con el fin de reducir o eliminar la microbiota acompañante presente en las muestras. Tras la evaluación de estos medios de cultivo en muestras artificialmente inoculadas con células de *H. pylori*, fue el agar Brucella suplementado (ABS) el que generó los mejores porcentajes de recuperación de la bacteria. Diversos autores han utilizado medios de cultivo suplementados con 5% de sangre de caballo desfibrinada para la detección y aislamiento de *H. pylori* en muestras ambientales (Gião *et al.*, 2011; Queralt y Araujo, 2007). Joo *et al.* (2010) evaluaron la técnica de cultivo líquido de capa fina para el crecimiento de *H. pylori* utilizando diversos medios de cultivo, encontrando que el caldo Brucella suplementado con 10% de sangre de caballo presentaba los mejores resultados. Buck y Oliver (2010) utilizaron el agar Brucella suplementado con 5% de sangre de oveja desfibrinada y antibióticos para el cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de vegetales en un ensayo *in vitro*.

Una de las limitaciones para cultivar y aislar *H. pylori* a partir de agua potable es la baja concentración en la que se puede encontrar, por lo que es fundamental conseguir la máxima eficiencia en la recuperación de la bacteria en el procesado de concentración de la muestra original. En este estudio, se evaluaron diferentes estrategias de concentración y cultivo para la recuperación de *H. pylori* de las muestras de agua cruda y potable en las 3 plantas potabilizadoras evaluadas.

Como se esperaba una baja concentración de células de *H. pylori* en el agua potable, se usaron dos estrategias para conseguir una detección más efectiva del patógeno. La primera fue el uso del método “hisopo de Moore” para la toma y concentración de la muestra, y la segunda fue un paso de enriquecimiento que se le realizó al eluido obtenido del hisopo. El uso del hisopo ha demostrado ser un método muy útil para aislar *Vibrio cholerae* y bacterias entéricas de aguas poco contaminadas (McEgan *et al.*, 2012), así como para detección de *Salmonella* en aguas superficiales y de fuentes (Fernández-Escartin *et al.*, 2002), *E. coli* O157 de suelos y aguas (Ogden *et al.*, 2001) y *V. cholerae* de aguas residuales (Rai *et al.*, 2012). Fernández *et al.* (2003) mostraron que la concentración de las muestras usando el “hisopo de Moore” produjo un 24.3% de muestras positivas para *Campylobacter* en comparación con el 7.2% de muestras positivas obtenidas por el método de filtración. Mediante esta técnica se obtuvo un mayor número de muestras positivas para *H. pylori* en el agua potable con respecto al agua cruda, probablemente debido al uso del “hisopo de Moore” para concentración de la muestra, el enriquecimiento previo de las muestras o ambos, y adicional a esto, el hecho de que en el agua potable se encuentra menos interferencia por presencia de microbiota acompañante.

En este estudio, para la concentración de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda y potable se utilizaron dos técnicas. La centrifugación, cuyo objetivo es concentrar las células de *H. pylori* presentes en las muestras de agua, ha sido una estrategia de concentración de la bacteria ampliamente utilizada tanto en aguas superficiales, como residuales, marinas y potables (Tirodimos *et al.*, 2014; Moreno y Ferrús, 2012; Nayak y Rose, 2007; McDaniels *et al.*, 2005). Por otra parte, la separación inmunomagnética (SIM) consiste en la asociación de perlas magnéticas sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal de adherencia a la superficie de *H.*

*pylori*, para facilitar el aislamiento de la bacteria y como método de pretratamiento para la PCR, ya que permite remover inhibidores de la PCR y una mejor detección de *H. pylori* en muestras de agua (Fernández-Delgado *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2002; Enroth y Engstrand, 1995). Tomando como base el trabajo de Enroth y Engstrand (1995), el método de concentración por SIM fue aplicado a las muestras tanto de agua cruda como potable después de su concentración por centrifugación. Este paso permite no solo recuperar *H. pylori* en función de sus propiedades inmunológicas, sino también eliminar sustancias contaminantes presentes en las muestras que pueden interferir con las técnicas de detección.

Así mismo, para la detección de *H. pylori* por cultivo se evaluaron 3 estrategias diferentes para cada tipo de matriz analizada. Para el agua cruda se realizó, 1) siembra directa a partir del sedimento obtenido por centrifugación resuspendido en PBS 1X, 2) siembra directa a partir del concentrado de SIM y 3) siembra del sedimento resuspendido en PBS 1X obtenido después del periodo de enriquecimiento. El análisis del agua potable se realizó, 1) siembra directa a partir del sedimento obtenido por centrifugación después del enriquecimiento, 2) siembra a partir del concentrado de SIM y 3) filtración por membrana de la muestra enriquecida.

Para evaluar el sistema de filtración, se realizó la evaluación de dos membranas de filtración de tamaño de poro diferente, encontrando que el filtro de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  era el que proporcionaba una mejor recuperación de la bacteria. Flores-Encarnacion *et al.* (2015) utilizaron membranas de filtración de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  para concentración de la bacteria a partir de muestras de agua de redes de distribución, obteniendo detección de *H. pylori* por PCR en el 44% (14/32) de las muestras analizadas. Al-Sulami *et al.* (2012) evaluaron muestras de agua potable de Basrah (Iraq) para detectar *H. pylori* por cultivo y PCR, las muestras fueron filtradas utilizando membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, sembradas en agar urea Columbia modificado y confirmadas por pruebas bioquímicas, subcultivado en agar HP y coloración de Gram, encontraron un 1.2% (6/471) de muestras positivas. El-Sharouny *et al.* (2015) en su estudio analizaron muestras de aguas superficiales y potables de Egipto y obtuvieron un 3.9% (2/51) de muestras positivas por cultivo

utilizando filtros de 0.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para la concentración de la muestra; estos resultados fueron confirmados por PCR.

La estrategia de siembra a partir del concentrado obtenido por SIM se aplicó a las muestras de agua cruda y potable. Sin embargo, esta estrategia no fue tan efectiva como se esperaba, y mostró el menor porcentaje de recuperación de las 3 estrategias de cultivo evaluadas: en el agua cruda 5.2% (8/155) y en agua potable 7.1% (11/155). Este hecho podría deberse a la baja concentración de células de *H. pylori* en las muestras, según los resultados obtenidos por qPCR, y a que probablemente estaban en la forma VNC; también el bajo porcentaje de unión de las perlas a la bacteria puede deberse a su estado morfológico, dado que, en función de su fisiología, la composición de los antígenos de membrana puede cambiar. Lu *et al.* (2002) obtuvieron 2 aislamientos de *H. pylori* a partir de 132 muestras de aguas residuales municipales no tratadas usando el método de SIM para concentrar las muestras. Enroth and Engstrand (1995) concluyeron que el límite de detección por cultivo de células de *H. pylori* en muestras de agua inoculadas es de  $10^4$  bacteria/mL. Así mismo, Nilsson *et al.* (1996) determinaron el límite de detección de esta técnica en  $10^4$  cells/mL en heces inoculadas.

De igual forma, para el análisis de muestras de agua cruda en este estudio se aplicó un paso de enriquecimiento, pero en estas muestras el porcentaje de resultados positivos fue mucho más bajo que el obtenido por siembra directa a partir del sedimento resuspendido en PBS 1X después de la centrifugación. Esto podría deberse al crecimiento masivo de la microbiota competitiva en las muestras, debido a la falta de especificidad del caldo de enriquecimiento (Fernández *et al.*, 2007)

De las estrategias evaluadas para la detección por cultivo de *H. pylori* a partir de las muestras de agua, en el agua cruda el método más efectivo fue la siembra directa de 0.1 mL de la suspensión en PBS 1X obtenida de la centrifugación de la muestra. Janson *et al.* (2009) utilizaron la estrategia de concentración por centrifugación para el análisis de muestras de agua potable y ambiental, pero en sus resultados no detectaron *H. pylori*. Moreno y Ferrús (2012) utilizaron el método de concentración por centrifugación para el cultivo de muestras de agua residual,

obteniendo 13.3% (6/45) de muestras positivas para *H. pylori* por cultivo confirmados por PCR y posterior secuenciación del fragmento amplificado.

En el agua potable el método más efectivo para la recuperación de *H. pylori* fue el de filtración por membrana (tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$ ) de la muestra enriquecida. Santiago *et al.* (2015) utilizaron el método de filtración por membrana y un enriquecimiento previo para el cultivo de *H. pylori* a partir de agua potable, y obtuvieron un 2.4% (1/24) de muestras positivas tras la confirmación por métodos moleculares.

Cuervo *et al.* (2017), en un estudio en muestras de agua potable, detectaron un 11.3% de muestras positivas utilizando una metodología de cultivo por siembra a partir de la muestra enriquecida después de la centrifugación, pero sus datos se basaron sólo en confirmación de las colonias por pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y oxidasa). En este trabajo se realizó una verificación inicial de los cultivos presuntivos de *H. pylori* por estas mismas 3 pruebas bioquímicas y se obtuvo un alto porcentaje positivos (61-65%), por lo que todos los cultivos presuntamente positivos se confirmaron por métodos moleculares, determinando así que la sola confirmación de cultivos presuntivos de *H. pylori* por estas 3 pruebas bioquímicas arroja un alto porcentaje de falsos positivos.

En este estudio, en el agua cruda se detectaron células cultivables de *H. pylori* en el 16.8% (26/155) de las muestras analizadas y en el agua potable en el 19.4% (30/155) de las muestras. Anteriormente se había conseguido muy pocas veces el cultivo de *H. pylori* a partir de este tipo de muestras. Por ejemplo, Al Sulami *et al.* (2012) aislaron *H. pylori* en el 2% de 198 muestras de agua potable analizadas. Santiago *et al.* (2015) lograron cultivar *H. pylori* de una muestra de 24 aguas potables, lo que confirma que *H. pylori* cultivable puede estar presente en los sistemas de distribución de agua potable.

A pesar de que en nuestro estudio se logró el cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda y potable, no se consiguió la obtención de colonias aisladas de la bacteria a partir de ninguna de ellas, aunque sí se pudo identificar en los cultivos

mixtos la presencia de *H. pylori* mediante FISH y PCR con posterior secuenciación del gen *vacA*.

La técnica FISH se utilizó para la identificación definitiva de colonias presuntivas en los cultivos mixtos. También permitió observar la morfología de las células de *H. pylori* presentes en el agua. Este método resultó ser muy eficaz para la identificación de *H. pylori* en las colonias, puesto que no requirió de una resiembra y posterior identificación bioquímica para confirmar su presencia. El uso de esta técnica podría reducir el tiempo empleado para la posterior purificación e identificación de colonias y generar resultados incluso cuando hay presencia de microbiota acompañante y la purificación no es posible, como en el caso de las muestras ambientales. Además del estudio actual, pocos grupos han logrado detectar *H. pylori* en muestras de agua no inoculadas utilizando el método FISH (Braganca *et al.*, 2007; Piqueres *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2003a). La detección de *H. pylori* por FISH puede permitir un análisis rápido de muestras de agua potable y ambientales, mejorando así su seguridad y calidad, y contribuyendo a dilucidar el papel del agua contaminada con materia fecal en la transmisión de la infección por *H. pylori* (Moreno *et al.*, 2003a).

El hecho de haber optimizado un protocolo para cultivar e identificar *H. pylori* a partir de muestras ambientales es un resultado de gran relevancia, debido a la dificultad que presenta su aislamiento. Cabe resaltar que en nuestro estudio todos los aislamientos de *H. pylori* obtenidos tanto de agua potable como cruda se confirmaron por secuenciación por el método de Sanger. Para ello se escogió el gen polimórfico *vacA*, que se encuentra en todas las cepas de *H. pylori* y está altamente conservado en la bacteria, utilizando la secuencia de iniciadores diseñados por Nilsson *et al.* (2002).

Un resultado a destacar de este estudio, es que no sólo se logró demostrar la viabilidad de *H. pylori* por el método de cultivo a partir de muestras de agua cruda y potable, sino que, además, se realizó la genotipificación de los cultivos positivos, dando así una visión de las características genotípicas y de virulencia de las cepas presentes en las muestras ambientales de la ciudad de Bogotá. En los 74 cultivos positivos de *H. pylori* detectados en agua cruda y potable, se encontró que el genotipo

más prevalente es *ureA,cagA-,glmM,vacAs1/m1* en 43.2% (32/74) de los cultivos positivos. Se ha descrito que las cepas que tienen el genotipo *vacAs1/m1*, que produce la toxina vacuolizante, causan mayor daño celular (Hemmatinezhad *et al.*, 2016).

Así mismo, el gen *cagA* se detectó en el 4% (3/74) de los cultivos positivos. Este gen codifica la proteína CagA, que confiere características patógenas a las cepas que lo contienen: las cepas *cagA+* se asocian con mayor inducción de interleukina 8 (IL-8) en el epitelio y mayor riesgo de producir úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer (Hemmatinezhad *et al.*, 2016; Keilberg y Ottermann, 2016). La presencia de cepas *cagA+* en muestras clínicas se asocia con síntomas graves, como gastritis severa, atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (Chromvarin *et al.*, 2008).

La detección e identificación de patógenos mediante PCR en muestras ambientales depende en gran medida de la especificidad de los iniciadores utilizados en la reacción de amplificación (Girones *et al.*, 2010). Para la detección y genotipificación de *H. pylori* a partir de las muestras de agua cruda y potable, se utilizaron los mismos genes que para los cultivos: *ureA* y *glmM* para la detección, y *cagA* y *vacA* para la determinación de genotipos marcadores de virulencia.

En primera instancia se utilizaron los iniciadores para la amplificación del gen *ureA* descritos por Moreno *et al.* (2003a) y Twing *et al.* (2011). Este gen codifica para la ureasa A, que es un factor importante de mantenimiento y virulencia de la bacteria en la mucosa gástrica (Otteman y Lowenthal, 2002) y está presente en el 100% de las cepas. Diversos estudios realizados a nivel mundial han utilizado este gen para detección de *H. pylori* en muestras ambientales (Cuervo *et al.*, 2017; Queralt *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2003a). Sin embargo, la utilización sólo de este gen para detección de *H. pylori* en muestras de agua puede generar falsos positivos, dado que es un gen que está presente en una amplia variedad de especies bacterianas que son frecuentes en el agua (Solomon *et al.*, 2007). La amplificación de este gen fue positiva en en el 38.7% (60/155) de las muestras de agua cruda y en el 38.7% (60/155) de las muestras de agua potable analizadas. De todas estas muestras, por secuenciación

del gen *vacA*, sólo se confirmaron como *H. pylori* positivo el 22.6% (35/155) y 27.1% (42/155) de las muestras de agua cruda y potable respectivamente, por lo que el resto se consideraron falsos positivos.

En este estudio también se amplificó el gen *glmM*, esencial para el desarrollo de la pared celular bacteriana, así como para el crecimiento del microorganismo (De Reuse *et al.*, 1997), y que ha sido ampliamente utilizado para confirmar la presencia de *H. pylori* en diferentes muestras, especialmente muestras clínicas. Lu *et al.* (1999) consideran que el gen *glmM* es un marcador más sensible y específico que *ureA* para la detección de *H. pylori*. Córdova-Espinoza *et al.* (2011) utilizaron los genes *glmM* y *ureA* en muestras de aislamientos clínicos de *H. pylori* obtenidos a partir de biopsias de pacientes pediátricos infectados. Montero-Campos *et al.* (2015) optimizaron la técnica de qPCR para la detección de *H. pylori* en muestras de agua potable provenientes de 2 países de centro América, utilizando el gen *glmM* como marcador. Sin embargo, en nuestro estudio este gen se detectó en menos muestras que *ureA*: el 11% (17/155) de las muestras de agua cruda y en el 7.7% (12/155) de las muestras de agua potable analizadas. Todas las muestras de agua positivas para *glmM* lo fueron también para la amplificación y secuenciación del gen *vacA*.

En este estudio, tan sólo el 13% (10/77) de las muestras positivas para *H. pylori* presentaron el gen *cagA*: el 2.6% (4/155) de las muestras de agua cruda y el 3.9% (6/155) de las muestras de agua potable analizadas. Estos resultados están acordes con los bajos porcentajes de cepas *cagA*+ de los cultivos. El resultado del estudio de Shahamat *et al.* (2006) sugiere que, durante la conversión a la forma cocoide, algunas cepas de *H. pylori* pierden total o parcialmente la proteína CagA. Este fenómeno también fue observado por Carbone *et al.* (2005), quienes detectaron el gen *cagA* en el 19.4% (7/36) muestras ambientales.

Al analizar las muestras de agua, se encontró que el genotipo *vacA s1/m1*, que causa mayor daño celular y se asocia a un riesgo 3,5 veces mayor de desarrollar cáncer, estaba presente en el 17.7% de las muestras de agua analizadas (55/310).

Teniendo en cuenta las características físico-químicas, la carga de materia orgánica y los altos niveles de contaminación de origen fecal e industrial que caracteriza el agua de entrada (cruda) de la PTAP 1, se esperaba un alto porcentaje de detección de *H. pylori* en las muestras, pero en esta planta se ha encontrado el porcentaje más bajo de detección (15,1%), lo cual podría deberse a la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR. Estos resultados se corroboran con el trabajo publicado por Abdolkazem *et al.* (2015) y Queralt y Ararujó (2007), quienes concluyeron que las muestras de aguas ambientales presentan inhibidores que afectan a la eficacia del método de PCR para la identificación de *H. pylori*.

Tras los resultados obtenidos mediante la PCR convencional se realizó el análisis para la detección y cuantificación de *H. pylori* en las muestras de agua y cultivos obtenidos a partir de las mismas mediante la técnica de qPCR, utilizando los iniciadores del gen *vacA* propuestos por Nilsson *et al.* (2002). Este gen fue escogido porque está presente en todas las cepas de *H. pylori* y se encuentra una sola copia del gen en el cromosoma de *H. pylori*, por lo que 1 unidad genómica (UG) equivale a 1 célula de la bacteria (Bernard *et al.*, 2005). Los resultados confirmaron una mayor especificidad de la qPCR frente a la PCR convencional, puesto que todas las muestras en las que se detectó la presencia de *H. pylori* fueron confirmadas por secuenciación, sin presentar ningún falso positivo. Para detectar pequeñas concentraciones de un patógeno, generalmente es necesario concentrar grandes volúmenes de agua, lo que puede conducir a la concentración simultánea de inhibidores de la qPCR (Moreno *et al.*, 2003b). Sin embargo, los controles de inhibición incluidos en nuestro análisis indicaron que las muestras parecen no contener sustancias inhibitoras que interfieren con la reacción de la qPCR.

El análisis de las muestras de agua por la técnica de qPCR determinó la presencia de *H. pylori* en 35 de 155 muestras de agua cruda (22.6%) y 42 de 155 muestras de agua potable (27.1%). La concentración de células de *H. pylori* solo se pudo cuantificar en 13 (8.4%) muestras de agua cruda, con concentraciones entre  $1,28 \times 10^1$  y  $4,69 \times 10^2$  unidades genómicas (UG)/reacción, lo que significa niveles de  $10^2$  a  $10^3$  células de *H. pylori*/mL en estas muestras de agua. Para las muestras de potable, aunque se logró cuantificar la cantidad de células en 20 de ellas (12.9%).

Hsay que considerar, sin embargo, que estos resultados no representan el nivel real de contaminación de las aguas, ya que el método de muestreo incluía un paso de preenriquecimiento.

Aunque la técnica de qPCR se ha usado previamente para detectar *H. pylori* en el agua potable en Estados Unidos (McDaniels *et al.*, 2005) y en agua potable o aguas residuales regeneradas en España, Costa Rica y Japón (Montero-Campos *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2015; Yáñez *et al.*, 2009; Horluchi *et al.*, 2001), según nuestro conocimiento, ningún estudio ha reportado con éxito la detección de *H. pylori* por qPCR en agua de entrada (cruda) y salida (potable) de diferentes plantas de tratamiento de agua potable. Nuestros resultados muestran que la PCR y qPCR son más sensibles que el cultivo para determinar la presencia de *H. pylori* en muestras de agua. Este hallazgo puede estar relacionado con el hecho de que la PCR y qPCR no diferencia entre células viables, viables no cultivables (VNC) y no viables.

Se ha sugerido que *H. pylori* persiste en el medio ambiente en forma cocoide viable pero no cultivable (Nayak y Rose, 2007; Saito *et al.*, 2003), por lo que la capacidad infectiva de *H. pylori* en condiciones ambientales sigue generando controversia. Wang *et al.* (2004) mostraron que la secuencia del gen *vacA* y su expresión en las formas cocoides coincide con la de las formas helicoidales de *H. pylori*. Algunos autores han detectado únicamente la presencia de ADN de *H. pylori*, pero no de células cultivables, en el agua potable (Khan *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2004). Santiago *et al.* (2015) utilizaron técnicas específicas como PMA-qPCR y DVC-FISH para detectar células viables de *H. pylori* en muestras de agua potable. Sus resultados mostraron la presencia de células viables de *H. pylori*, que no pudieron ser detectadas por cultivo, en el 25% de las muestras.

Este estudio, no solo demuestra la presencia de *H. pylori* en el agua potable en una etapa viable y cultivable, sino que también muestra que el tratamiento del agua en las plantas de potabilización no es totalmente efectivo para eliminar *H. pylori*. Nuestros resultados muestran que *H. pylori* está presente (27.1%) y viable (19.4%) en muestras de agua potable incluso después de la cloración. Estudios previos han descrito que *H. pylori* pierde su capacidad de cultivo en contacto con el cloro durante

cortos períodos de tiempo (1-5 min), aunque sigue siendo potencialmente patógeno en el estado VNC (Moreno *et al.*, 2007). Nuestros hallazgos confirman que *H. pylori* puede sobrevivir a las prácticas de desinfección comúnmente utilizadas en las plantas de tratamiento de agua potable (Santiago *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 1997).

La Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos, ha incluido a *H. pylori* dentro de la lista de candidatos contaminantes del agua (CCL), con el fin de incorporar su control a la legislación que rige la normativa de control ambiental de patógenos (USEPA, 2004). Sin embargo, en el agua potable se dispone de datos limitados sobre la presencia de *H. pylori* y el tipo de tratamiento del agua potable, por lo que aún no se ha llevado a cabo una evaluación cuantitativa del riesgo microbiano (“QMRA”, por sus siglas en inglés) formal para *H. pylori* en el agua (Ryan *et al.*, 2014), probablemente por la baja concentración en la que se detecta. Por el momento, *H. pylori* permanece como candidato a la espera de obtener un método estandarizado para su detección e identificación en muestras ambientales.

En la última parte de este trabajo se trató de determinar si existe relación entre la presencia de *H. pylori* en el agua y los indicadores de contaminación microbiológica, así como los parámetros físico-químicos comúnmente analizados en las aguas.

*Clostridium* sp. se ha propuesto como indicador de la presencia de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras ambientales, gracias a la formación de esporas que tendrían un comportamiento similar a las estructuras de resistencia de estos parásitos (Cheng *et al.*, 2012; Harwood *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 1996; Payment y Franco, 1993). Teniendo en cuenta las formas de resistencia que presenta *H. pylori* en las muestras ambientales y que su comportamiento puede variar en relación a los indicadores tradicionales de contaminación fecal (coliformes totales y *E. coli*), en el presente estudio se evaluó la presencia de esporas de *Clostridium* sulfito reductor como posible indicador de la presencia de *H. pylori* en aguas crudas y potables.

Los valores de la concentración promedio de los coliformes totales en las tres plantas de potabilización evaluadas se encontraban dentro de los valores máximos

permitidos por el Decreto 1594 de 1984 ( $2 \times 10^4$  ufc/100mL); sólo el valor máximo de la PTAP 1 sobrepasó los límites propuestos por la normatividad colombiana.

Se encontró una mayor concentración del grupo de los coliformes totales en comparación con las esporas de *Clostridium* sulfito reductor. Bisson y Cabelli (1980), reportan que la concentración de esporas de *Clostridium* spp., en comparación a la concentración de *E. coli*, siempre será menor cuando se evalué en el agua, y es lo encontrado en las muestras de agua cruda que entra a las PTAP 1 y 3; en el caso del agua que entra a la PTAP 2, sin embargo, se ha encontrado que la concentración de esporas de *Clostridium* sulfito reductor es mayor que la de *E. coli*.

La PTAP 1 es la que muestra mayor concentración promedio de los tres indicadores. Esto se debe probablemente a que el agua de captación de esta planta pertenece a la dársena a la que llega el agua del río Bogotá, uno de los ríos más contaminados de Colombia. Las concentraciones de los indicadores de contaminación fecal en el río Bogotá son reflejo de los constantes vertidos de aguas residuales que recibe a lo largo de su recorrido. Sin embargo, cabe resaltar que los valores del agua de entrada de la planta son más bajos que los encontrados en el río Bogotá propiamente, ya que antes de entrar al sistema de tratamiento, el agua se mezcla con agua de la dársena y permanece allí por varios días favoreciendo la disminución de la concentración de los microorganismos por acción de la sedimentación, rayos ultravioletas, cambios de pH y otros factores ambientales (Campos *et al.*, 2008).

La PTAP 3 fue la que presentó menor concentración de los tres microorganismos indicadores. Esto puede deberse a que el agua proviene en mayor porcentaje del páramo de Chingaza, lo que permite diluir la carga microbiana que presenta el río Teusacá cuando se mezcla. Esta dilución se da una vez los dos cuerpos de agua entran en contacto en el embalse de San Rafael.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en el agua potable cumplen con los valores propuestos en la Resolución 2115 de 2007, la cual establece las características microbiológicas del

agua apta para consumo humano, en donde los valores máximos aceptables para coliformes totales y *E. coli* debe ser 0 o <1 ufc/100mL, utilizando la técnica de filtración por membrana.

Existen datos limitados sobre la asociación de indicadores de transmisión hídrica y la presencia de *H. pylori*. Braganca *et al.* (2005), al igual que Baker y Hegarty (2001), en sus trabajos con biopelículas, han demostrado que *H. pylori* es más resistente a la cloración que *E. coli*. Hegarty *et al.* (1999) no encontraron correlación entre la presencia de ADN de *H. pylori* en el agua de consumo y la presencia de *E. coli*, sugiriendo que este indicador falla cuando se utiliza como único criterio de potabilidad del agua. Nuestro análisis estadístico también mostró que no existe ningún tipo de relación directa entre los indicadores de contaminación fecal evaluados y la presencia de *H. pylori* en el agua cruda ni potable analizada. Esto sugiere que la presencia de *H. pylori* en las muestras de agua no puede ser evaluada mediante la detección de las bacterias indicadoras de contaminación fecal tradicionales y que las variaciones que puedan presentarse en la concentración de coliformes totales, *E. coli* o esporas de *Clostridium* sulfito reductor no pueden ser tomadas como indicativo para suponer la presencia o ausencia de *H. pylori* en el agua cruda ni potable.

Nuestros resultados, por tanto, resaltan la importancia de realizar controles periódicos para la detección de patógenos específicos, dado que el solo control de los indicadores de contaminación fecal como *E. coli* o esporas de *Clostridium* sulfito reductor no son indicativos de la presencia de patógenos de gran relevancia para la salud pública como *H. pylori*.

De igual forma, en este estudio no se encontró ninguna correlación entre la presencia de *H. pylori* y la concentración de los parámetros fisicoquímicos evaluados (pH, turbidez, conductividad y cloro residual libre) en el agua. Por tanto, las variaciones que puedan presentarse en la concentración de alguno de estos parámetros tampoco pueden ser tomadas como indicativo para suponer la presencia o ausencia del patógeno en el agua.

Los resultados de este estudio demuestran que células viables y cultivables de *H. pylori* están presentes tanto en el agua cruda como en la potable de las plantas potabilizadoras analizadas, evidenciando que el agua contaminada podría ser un vehículo de transmisión de este patógeno emergente. Es importante tener en cuenta, que la dosis infectante de *H. pylori* estimada para el ser humano es  $10^4$ - $10^{10}$  UFC/L (Graham *et al.*, 2004), niveles muy superiores a los encontrados en el agua en este trabajo. Se requieren más estudios para determinar la concentración bacteriana presente en el agua y, además, estimar su potencial infeccioso, antes de poder evaluar si el consumo continuado de agua contaminada con *H. pylori* a las concentraciones encontradas en este trabajo es, o puede llegar a ser, causante de infección a la población.

## 7. CONCLUSIONES

1. La estrategia de cultivo que ofrece los mejores resultados para la detección de *H. pylori* a partir de muestras de agua cruda es la siembra en masa a partir de la suspensión del sedimento obtenido por centrifugación. Para el agua potable, la técnica más efectiva es la filtración por membrana.
2. La técnica FISH ha demostrado la presencia de células de *H. pylori* en los cultivos obtenidos a partir del agua, observándose células en forma cocoide y bacilar, tanto en agua cruda como potable.
3. Mediante amplificación por PCR convencional de los genes *ureA*, *glmM* y *vacA* se ha detectado ADN de *H. pylori* en el agua cruda y potable de las 3 plantas potabilización.
4. El genotipo de *H. pylori* más prevalente en el agua es *cagA*-, *vacA* *m1/s1*.
5. La técnica de qPCR ha permitido la cuantificación de *H. pylori* en el 8.4% y 12.9% de las muestras de agua cruda y potable analizadas. En la mayoría de las muestras, sin embargo, los niveles de contaminación por *H. pylori* se encuentran por debajo del límite de cuantificación de esta técnica.
6. No existe relación entre los indicadores de contaminación fecal evaluados y la presencia de *H. pylori* en el agua cruda. Por tanto, las variaciones que puedan presentarse en la concentración de estos indicadores no pueden ser tomados como indicativo para suponer la presencia o ausencia de *H. pylori* en el agua cruda. Así mismo, las esporas de *Clostridium* sulfito reductor demostraron no ser un indicador que tenga comportamiento similar a *H. pylori*.
7. No se ha encontrado relación entre la turbidez, la conductividad y el cloro residual, ni la variación del pH con respecto a la presencia y/o ausencia de *H. pylori*, tanto en el agua cruda como potable. Por tanto, las variaciones que puedan presentarse en alguno de estos parámetros no pueden ser tomadas al menos en este caso, como indicativo para suponer la presencia o ausencia de la bacteria en el agua.
8. La combinación del método de cultivo con métodos moleculares como PCR, FISH o qPCR, parece la más adecuada para abordar la detección,

identificación, visualización directa y determinación de la viabilidad de las células de *H. pylori* presentes en muestras altamente contaminadas, como es el caso del agua de entrada a las plantas (agua cruda) y de igual forma en muestras de agua donde la concentración esperada de *H. pylori* es muy baja, como es el caso del agua potable.

9. De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone el protocolo combinado de cultivo con la técnica de qPCR, utilizado en esta tesis, para el control eficaz de la presencia de *H. pylori* en aguas.
10. Los resultados de este estudio demuestran que células viables y cultivables de *H. pylori* están presentes tanto en el agua de entrada (cruda) como en la de salida (potable) de las plantas potabilizadoras analizadas, evidenciando que el agua contaminada podría ser un vehículo de transmisión de este patógeno emergente. Para evaluar el riesgo real al que está expuesto el consumidor sería necesario determinar el potencial infeccioso de estas células.
11. Tomando como base los resultados de este estudio, podemos asociar la presencia de *H. pylori* en el agua como un indicador de la calidad del proceso en las plantas de tratamiento, dado que la bacteria ha demostrado ser resistente a las concentraciones de cloro usadas normalmente en el proceso de potabilización.
12. Los resultados de este trabajo plantean la necesidad de revisar la eficacia de los métodos de potabilización aplicados habitualmente al agua, puesto que se ha demostrado la capacidad de *H. pylori* de resistir a los mismos y permanecer viable tras el proceso de potabilización.

## 8. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

- ✓ La detección de *H. pylori* en muestras de agua es dispendiosa, sin embargo, para llevar a cabo este proceso en el agua potable, se sugiere la técnica de qPCR, con previa concentración de la muestra usando el “hisopo de Moore” y posterior elusión para la extracción del ADN. Y en el caso del agua cruda, se sugiere realizar la concentración de la muestra por centrifugación y suspensión del sedimento en PBS, para posterior extracción del ADN.
- ✓ Se sugiere continuar con estudios de la presencia de *H. pylori* en redes de distribución de agua potable y biopelículas, al igual que en las diferentes etapas del proceso de tratamiento de potabilización, para así determinar si este patógeno puede servir como control en la calidad del agua.
- ✓ Para realizar evaluación del riesgo a la salud pública que puede implicar la presencia de *H. pylori* en el agua potable, se requieren nuevos estudios para determinar la dinámica poblacional de la bacteria en el agua, que proporcionen estimaciones del número de células y su estado fisiológico (VNC, muertas, o viables y cultivables).
- ✓ Además, es importante conducir estudios *in vitro* para determinar la infectividad de las cepas de *H. pylori* encontradas en el agua, y con esto poder estimar el riesgo de infección.
- ✓ Finalmente, se ha determinado que *H. pylori* puede cohabitar con amebas y zooplancton, los cuales le sirven de protección al proceso de desinfección, ayudándolo a sobrevivir con éxito en el agua y potencialmente permitir que se transmita a los humanos. La investigación de las interacciones entre *H. pylori* y estos organismos, podría contribuir a la evaluación del posible riesgo de la transmisión de *H. pylori* a través del agua.

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

### Artículo.

**“Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants from Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques”.**

Vesga, Fidson-Juarismy<sup>1,2</sup>; Moreno, Yolanda<sup>2</sup>; Ferrús, María Antonia<sup>3</sup>; Campos, Claudia<sup>1</sup> and Trespalcios, Alba Alicia<sup>1</sup>.

1. Microbiology Department, Science Faculty, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá 110231, Colombia.
2. Research Institute of Water Engineering and Environment (IIAMA), Universitat Politècnica de València, Valencia 46022, Spain.
3. Biotechnology Department, ETSIAM, Universitat Politècnica de València, Valencia 46022, Spain.

*International Journal of Hygiene and Environmental Health* (2018). 221, 595–601.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.010>

Presentación en congresos nacionales e internacionales en el formato de **Poster**:

1. **Detección de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización.** Fidson-Juarismy Vesga, Lina María Ledesma-Gaitán, Eliana Rodríguez, Claudia Campos y Alba Alicia Trespalcios. Bogotá Microbial Meeting – BoMM 2016. Agosto 12 de 2016, Bogotá, Colombia.
2. **Detection of *Helicobacter pylori* by FISH and PCR techniques in drinking water treatment plants (DWTP) from Colombia.** Vesga, Fidson-Juarismy; Moreno, Yolanda; Ferrús, María Antonia; Campos, Claudia y Trespalcios, Alba Alicia. Water and Sanitation Safety Planning and Extreme Weather, IWC 2017. Conference 6 – 7 April 2017 in Bilthoven, The Netherland.
3. **Detección y viabilidad de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en Bogotá, Colombia.** Vesga, Fidson-Juarismy; Moreno, Yolanda; Ferrús, María Antonia; Campos, Claudia y Trespalcios, Alba

Alicia. IV encuentro de estudiantes de doctorado Universitat Politècnica de València. Junio 1 de 2017, Valencia, España.

4. **Detección y viabilidad de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en Bogotá, Colombia.** Vesga, Fidson-Juarismy; Moreno, Yolanda; Ferrús, María Antonia; Campos, Claudia y Trespacios, Alba Alicia. II encuentro de Investigación del Posgrado de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Junio 2 de 2017, Bogotá, Colombia.
5. **Detection of *Helicobacter pylori* by PCR of the *glmM* gene in surface water from Bogotá (Colombia).** Vesga, Fidson-Juarismy; Moreno, Yolanda; Ferrús, María Antonia; Campos, Claudia y Trespacios, Alba Alicia. FEMS 7TH Congress of European Microbiologists. July 9-13 2017, Valencia, Spain.
6. **Detection of *Helicobacter pylori* by qPCR of the *vacA* gene in drinking water.** Vesga, Fidson-Juarismy; Moreno, Yolanda; Ferrús, María Antonia; Campos, Claudia y Trespacios, Alba Alicia. XXX<sup>th</sup> Internacional Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer. September 7-9 2017. Bordeaux, France.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**A**

Abdolkazem, N., Zeynab, B., Mojtaba, M., Soheila, K. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* in raw and drinking water of Ahvaz City, Iran by PCR. *J Pure Appl Microbio.* 9(1), 483-490.

Ainsworth, R. (2004). Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems. IWA Publishing, London, for the World Health Organization, Geneva.

Akcam, Y., Ersan, S., Alper, M., Bicik, Z., Aytug, N. (2000). The transmission of *Helicobacter pylori* via exposure to common sources outweighs the person- to-person contact among spouses in developing countries. *American J Gastroenterology.* 95, 317-319

Al-Sulami, A., Al-Edani, T.A.A., Al-Abdeula, A.A. (2012). Culture method and PCR for the detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterology. Res. Pract.* Article ID 245167, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/245167>.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid. Res.* 25(17), 3389-3402.

American Public Health Association (APHA). (2012). Standard method for examination of water and wastewater. 22th edition. American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation. Washington, D.C., United States.

Amman R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59: 143-169.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., (1990). Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6), 1919-1925.

An, Y.J., Yoon, C.G., Jung, K.W., Ham, J.H. (2007). Estimating the microbial risk of *E. coli* in reclaimed wastewater irrigation on paddy field. *Environ. Monitoring Assess.* 129, 53-60.

Andersen, L., Rasmussen, L. (2009). *Helicobacter pylori* - coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 56,112–115.

Andersen, A.P., Elliot, D.A., Lawson, M., Barland, P., Haatcher, V.B., Puszkun, E.G., (1997). Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2918–2922.

Arévalo, A., Trespalacios, A.A., Otero, W. (2009). Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Rev. Col. Gastroenterol.* 24 (4).

Atapoor, S., Dehkordi, F.S., Rahimi, D. (2014). Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur J Microbiol.* 7 (5), e10013. doi: 10.5812/jjm.10013.

Atherton, J.C. (1998). *Helicobacter pylori* virulence factors. *Br. Med. Bull.* 54, 105-20.

Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M.Jr., Tummuru, M.K., Blasér, M.J., Cover, T.L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270, 17771-7.

Azevedo, N.F., Almeida, C., Fernandes, I., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J. (2008). Survival of gastric and Enterohepatic *Helicobacter* spp. in Water: Implications for Transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(6), 1805 – 1811. doi:10.1128/AEM.02241-07.

Azevedo, N.F., Almeida, C., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J. (2007). Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(10), 3423–3427. doi:10.1128/AEM.00047-07.

Azevedo, N.F., Pacheco, A.P., Keevil, C.W., Vieira, M.J., (2004). Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1), 490 – 493. DOI: 10.1128/AEM.70.1.490–493.2004.

Aziz, R.K., Khalifa, M.M., Sharaf, R.R. (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J. Adv Res.* 6, 539 – 547. doi:10.1016/j.jare.2013.07.007.

---

**B**

---

Bahrami, A.R., Rahimi, E., Safaei, H.G., (2013). Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental units' water and bottled mineral water in Isfahan, Iran. *Sci. World. J.* ID 280510, 1-5. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/280510>.

Baker, K.H., Hegarty, J.P. (2001). Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 33, 744–746. DOI: 10.1080:00365540110026881.

Bamford, K.B., Lutton, D.A., O' Loughlin, B., Coulter, W.A., Collins, J.S., 1998. Nested primers improve sensitivity in the detection of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *Journal of Infection* 36, 105–110.

Bartram, J. (2003). Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. WHO Emerging Issues in Water and Infectious Disease Series. London, IWA Publishing.

Bengtsson, M., Karlsson, H.J., Westman, G., Kubista, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 31, DOI: 10.1093/nar/gng045.

Benson, J.A., Fode-Vaughan, K.A., Collins, M.L.P., (2004). Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 39(3), 221–225. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01555.x.

Bernard, M., Cappon, A., Pancotto, L., Ruggiero, P., Rivera Giuseppe Del Giudice, J., Montecucco, C. (2005). The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cel. Microbiol.* 7 (2), 191-198.

Bisson, J., Cabelli, V. (1980). *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. *Res. J. Water Pollution Control Federation.* 52(2), 241-247.

Blum, A.L. (1997). An historical overview of *Helicobacter*-associated disorders. *The Immunobiology of H. pylori.* New York. XIV-XIX.

Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P., (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 111, 483-490.

Boehnke, K., Brewster, R.K., Sánchez, B.N., Valdivieso, M., Bussalleu, A., Guevara, Gonzales Saenz, C., Osorio Alva, S., Gil, E., Xi, C. (2018). An assessment

of drinking water contamination with *Helicobacter pylori* in Lima, Peru. *Helicobacter*, 1 – 8. DOI: 10.1111/hel.12462.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J.A., Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (8), 601-608.

Braganca, S.M., Azevedo, N.F., Simoes, L.C., Keevil, C.W., Vieira, M.J., (2007). Use of fluorescent in situ hybridization for the visualization of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms. *Water. Sci. Technol.* 55(8-9), 387-393. DOI: 10.2166/wst.2007.282.

Braganca, S. (2005). Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms formed in a real drinking water distribution system using peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization. In *Biofilms: Persistence and Ubiquity*, edited by A. McBain, D. Allison, J. Pratten, D. Spratt, M. Upton and J. Manchester. 2005. Biofilm Club.

Brechtbuehl, K., Whalley, S.A., Dusheiko, G.M., Saunders, N.A. (2001). A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J. Virol. Methods* 93, 105-113.

Brown, L.M. (2000). *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 22(2), 283 – 297.

Buck, A., Oliver, J.D. (2010). Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state. *Food Control.* 21, 1150–1154. doi:10.1016/j.foodcont.2010.01.010.

Buse, H.Y., Schoen, M.E., Ashbolt, N.J. (2012). *Legionellae* in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water Research.* 46(4), 921–933.

## C

---

Cavalcante, M.Q., Silva, C.I., Braga-Neto, M.B., Fialho, A.B., Nunes Fialho, A., Barbosa, A.M., Cruz, F.W., Rocha, G.A., Queiroz, D.M., Braga L.L. (2012). *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 107(4), 561-563.

Campos C, Cardenas M, Guerrero A (2008) Performance of faecal contamination indicators in different types of waters from the sabana of Bogotá - Colombia. *Universitas Scientiarum*. 13(2): 103-108.

Carbone, M., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Camera, E., Biondo, C., Fera, M.T., (2005). Occurrence of *Helicobacter pylori* DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina). *J. Appl. Microbiol.* 98, 768–774. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02517.x.

Cellini, L., Del Vecchio, A., Di Candia, M., Di Campi, E., Favaro, M., Donelli, G., (2004). Detection of free and plankton associated *Helicobacter pylori* in seawater. *J. Appl. Microbiol.* 97(2), 285–292. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02307.x.

Cheng, H.W., Broaders, M.A., Lucy, F.E., Mastitsky, S.E., Graczyk, T.K. (2012). Determining potential indicators of *Cryptosporidium* oocysts throughout the wastewater treatment process. *Water Sci Technol.* 65(5), 875 - 882. doi: 10.2166/wst.2012.918.

Chomvarin, C., Wongboot, W., Tirapattanun, A., Kanthawong, S., Wongwajana, S., Tongpim, S., Boonyanugomo, W. (2017). Detection of *Helicobacter pylori* in aquatic environments and drinking waters in Northeastern Thailand. *Chiang Mai J. Sci.* 44(3), 731-741. <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>

Chomvarin, C., Namwat, W., Chaicumpar, K., Mairiang, P., Sangchan, A., Sripa, B., Tor-Udom, S., Vilaichonee, R.K. (2008). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *International J. Infect. Dis.* 12(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.03.012>.

Cittelly, D.M., Huertas, M.G., Martínez, J.D., Oliveros, R., Posso, H., Bravo, M.M. (2002). *Helicobacter pylori* genotypes in non-atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia. *Rev Med Chile.* 130,143-51.

Córdova Espinoza, M.G., González, R., Morales, I., Ruelas, C., Giono, S. (2011). Detection of the *glmM* in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 49(4), 1650-1652. doi:10.1128/JCM.00461-10.

Coudron P.E., Stratton C.W. (1995). Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1028–1030.

Cover, T.L., Blanke, S.R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(3), 20-32.

Cuervo, C.M., Gaviria, A.M., (2017). Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. *Acta Med. Colomb.* 42(2), 121-128.

Cunachi, A.M., Fernández-Delgado, M., Suárez, P., Contreras, M., Michelangeli, F., García-Amado, M.A. (2015). Detection of *Helicobacter* DNA in different water sources and penguin feces from Greenwich, Dee and Barrientos Islands, Antarctica. *Polar. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00300-015-1879-5>.

## D

---

De Reuse, H., Labigne, A., Mengin-Lecreux, D. (1997). The *Helicobacter pylori* ureC Gene Codes for a Phosphoglucosamine Mutase. *J. Bacteriol.* 179(11), 3488–3493.

Degnan, A.J., Sonzogni, W.C., Standridge, J.H., (2003). Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5), 2914–2918.

Dorevitch, S., Pratap, P., Wroblewski, M., Hryhorczuk, D.O., Li, H., Liu, L.C., Scheff, P.A. (2012). Health risks of limited-contact water recreation. *Environ. Health Perspectives*, 120(2), 192-197.

Doyle, M.P. (1990). Pathogenic *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet.* 336(8723),1111-1115.

Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(4), 720 – 741.

Duque-Jamaica, R., Arévalo-Galvis, A., Poutou-Piñales, R.A., Trespalacios, A.A. (2010). Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 15, 303–312.

Duś, I., Dobosz, T., Manzin, A., Loi, G., Serra, C., Radwan-Oczko, M. (2013). Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research – new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postepy Hig Med Dosw* (online); 67: 261-268.

DVGW - German Alliance of Water Management Associations. (2011). Profile of the German Water Sector. Disponible en: <http://www.wvgw.de>.

## E

---

Eaton, K.A., Catrenich, C.E., Makin, K.M., Krakowka, S. (1995). Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis.* 171: 459-462.

El-Sharouny, E., El-Shazli, H., Olama, Z. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in some egyptian water systems and its incidence of transmission to individuals. *Iran J Public Health.* 44(2), 203-210. <http://ijph.tums.ac.ir>

Engstrand, L. (2001). *Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission Journal of transmission. *Appl. Microbiol.* 90, 80S-84S.

Enroth H., Engstrand L. (1995). Immunomagnetic Separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33(8), 2162–2165.

Erzin, Y., Koksall, V., Altun, S., Dobrucali, A., Aslan, M., Erdamar, S., Dirican, A., Kocazeybek, B. (2006). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 11, 574-580.

Euzéby, J.P., Tindall, B.J. (2016). Valid Publication of New Names or New Combinations: Making Use of the Validation Lists. Disponible en: <http://www.bacterio.net/-Euzéby-Tindall.html>.

## F

---

FAO/WHO. (2003). Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines. Geneva, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (Microbiological Risk Assessment Series No. 3). Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/pathogen.pdf>.

Ferguson C., Coote B., Ashbolt L., Stevenson I. (1996). Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research,* 30, 2045-2054.

Fernández, M., Contreras, M., Suárez, P., Gueneau, P., García-Amado, M.A., (2007). Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with other enteric bacteria in seawater and marine mollusks. *Lett. Appl. Microbiol.* 45(2), 213 - 218.

Fernandez, H., Otth, L., Wilson, M. (2003) Isolation of thermo tolerant species of *Campylobacter* from river water using two collection methods. *Arch. Med. Vet.* 35,95–97.

Fernández-Delgado M., Contreras M., García-Amado M.A., Michelangeli F., Suárez P. (2008). Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. *Interciencia.* 33(6), 412 -417

Fernández-Escartín, E., Saldaña-Lozano, J., Rodríguez-García, O., Cliver, D.O. (2002). Potential *Salmonella* transmission from ornamental fountains. *J Environ. Health.* 65(4), 9-12, 22.

Flores-Encarnación, M., Meza-de la Rosa, J.L., Aguilar-Gutiérrez, G.R., Cabrera-Maldonado, C., Aquino-Bonilla, A.G., Enríquez-Guerra, M.A., Herrera-Romero, A.U. (2015). Presence of *Helicobacter pylori* into municipal water in common use. *Basic. Res. J. Medic. Clin. Sci.* 4(6), 180-185. <http://www.basicresearchjournals.org>

Formaselect. (2007). Manual de tratamiento de agua. Unidad Potabilización de Agua. España. Disponible en: [www.formaselect.com](http://www.formaselect.com)

Francy D., Helsel D., Nally R. (2000). Ocurrence and distribution of microbiological indicators in groundwater and stream water. *Water Environ. Res.* 72:152-161.

Fuchs, B.M., Syutsubo, K., Ludwing, W., Amann, R. (2001). In situ accesibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluourescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 961-968.

Fux, C., Costerton, J., Stewart, P., Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13(1), 34-40.

## G

---

Gesche, E., Vallejos, A., Sáez, M. (2003). Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más

Probable (NMP). *Arch. Med.* 35(1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100011>.

Gião M.S., Azevedo N.F., Wilks S.A., Vieira M.J., Keevil C.W. (2011). Interaction of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori* with bacterial species isolated from drinking water biofilms. *BMC Microbiol.* 11, 57. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/57>.

Giaõ M.S., Azevedo N.F., Wilks S.A., Vieira M.J., Keevil C. W. (2010). Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(5), 1669–1673. doi:10.1128/AEM.01378-09.

Giaõ, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J., Keevil, C.W. (2008). Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5898-5904. doi:10.1128/AEM.00827-08.

Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Correa, A.A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Wat. Res.* 44, 4325-4339. doi:10.1016/j.watres.2010.06.030.

Goh, K.L., Chan, W.K., Shiota, S., Yamaoka, Y. (2011). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter.* 16 Suppl 1, 1-9. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00874.x.

Goodman K.J., Correa P., Tengana Aux H.J., Ramirez H., DeLany J.P., Guerrero Pepinosa O., Lopez Quiftones M., Collazos Parra T. 1996. *Helicobacter pylori* Infection in the Colombian Andes: A Population-based Study of Transmission Pathways. *American Journal of Epidemiology*, Vol. 144, No. 3.

Goodwing, C., Armstrong, A.J. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 9, 1-13.

Graham, D.Y., Opekun, A.R., Osato, M.S., El-Zimaity, H.M., Lee, C.K., Yamaoka, Y., Monath, T.P. (2004). Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut.* 53, 1235–1243.

Gray N. (1996). *Calidad del Agua Potable, Problemas y Soluciones*. Acribia S.A., Zaragoza. España.

Guimarães, N.M., Azevedo, N.F., Vieira, M.J., Figueiredo, C. (2014). Water-induced modulation of *Helicobacter pylori* virulence properties. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 109(4), 414-419. doi: 10.1590/0074-0276140024.

## H

Harper, C.G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N.S., Kinsel, M., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A., Fox, J.G. (2002). *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4536–4543. DOI: 10.1128/JCM.40.12.4536–4543.2002.

Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S., Rose, J.B. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6), 3163–3170. doi:10.1128/AEM.71.6.3163–3170.2005.

He, Q., Wang, J.P., Osato, M., Lachman, L.B. (2002). Real-Time Quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 40(10), 3720–3728. DOI: 10.1128/JCM.40.10.3720–3728.2002.

Hegarty, J.P., Dowd, M.T., Baker, K.H. (1999). Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 87, 697-701.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986-994

Hemmatinezhad, B., Momtaz, H., Rahimi, E. (2016). *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. *Ann. Clin. Microbiol. Antimic.* 15, 2. DOI 10.1186/s12941-015-0115-z.

Henao, S.C., Otero, W., Angel, L.A., Martinez, J.D. (2009). Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. *Rev. Col. Gastroenterol.* 24, 10 - 16.

Herrera-Romero, A.U., Aguilar-Gutiérrez, G.R., Flores-Encarnación, M. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in purified water for drinking. *Global Adv. Res. J. Med. Med. Sci.* 4(4), 176-182. <http://garj.org/garjmms/index.htm>.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*. 11, 1026-1030.

Hijnen W.A.M., Willemsen-Zwaagstra J., Hiemstra P., Medema G.J., Van Der Kooij D. (2000). Removal of sulphite-reducing clostridia spores by full-scale water treatment processes as a surrogate for protozoan oocysts removal. *Water Science and Technology* 41: 165- 171.

Hill D. (2006). Microbiology for drinking water personnel: American Water Works Association. Editorial AWWA. Estados Unidos.

Horluchi, T., Ohkusa, T., Watanabe, M., Kobayashi, K., Miwa, H., Eish, Y. (2001). *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol. Immunol.* 45(7), 515-519.

Hu, Y., Wan, J.H. Li, X.Y. Zhu, Y. Graham, D.Y. Lu, N.H. (2017). Systematic review with meta-analysis: the global recurrence rate of *Helicobacter pylori*. *Alimen. Pharmac. Therap.* 46(9), 773-779. <https://doi.org/10.1111/apt.14319>.

Hulten, K., Enroth, H., Nystrom, T., Engstrand, L. (1998). Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *J. Appl. Microbiol.* 85, 282-286.

Hulten, K., Han, S., Enroth, H., Klein, P., Opekun, A., Gilman, R., Evans, D., Engstrand, L., Graham, D., El-Zaatari, F. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*. 110,1031–1035.

## I

---

Instituto Nacional de Salud (INS). (2016). Informe nacional de calidad del Agua para consumo humano. IRCA 2015. Bogotá, D.C. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/inca-2015\\_reducido.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/inca-2015_reducido.pdf)

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1994. Working group IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. 61. Lyon (France): IARC.

Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y. (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal. Biochem.* 229, 207-213

International Organization for Standardization (ISO): 9308-1. (2014). Water Quality- Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria – Part 1: Membrane Filtration Method for Water with low bacteria background flora.

International Organization for Standardization (ISO): 6461-2. (1986). Water Quality- Detection and Enumeration of the Spores of Sulfite-Reducing Anaerobes (*Clostridia*) – Part 2: Method by Membrane Filtration.

## J

---

Janzon, A., Sjöling, Å., Lothigius, Å., Ahmed, D., Qadri, F., Svennerholm, A.M. (2009). Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive Real-Time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10), 3039–3044. doi:10.1128/AEM.02779-08.

Johnson, C.H., Rice, E.W., Reasoner, D.J., (1997). Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4969–4970.

Jones, K.R., Jang, S., Chang, J.Y., Kim, J., Chung, I.S., Olsen, C.H., Cha, J.H. (2011). Polymorphisms in the intermediate region of *VacA* impact *Helicobacter pylori*-induced disease development. *J. Clin. Microbiol.* 49(1), 101 – 110. <http://doi.org/10.1128/JCM.01782-10>.

Jungfer, C., Schwartz, T., Obst, U. (2007). UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Research.* 41(1), 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.001>

## K

---

Kabir, S. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in faeces and saliva by Polymerase Chain Reaction: a Review. *Helicobacter* 9, 115-123.

Keilberg, D., Ottemann, K.M. (2016). How *Helicobacter pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. *Environ. Microbiol.* 18(3), 791–806. doi:10.1111/1462-2920.13222.

Kelly, S.M., Geraghty, J.M., Neale, G. (1994). *Helicobacter pylori*, gastric carcinoma and MALT lymphoma. *Lancet.* 343, 418.

Khan, A., Farooqui, A., Kazmi, S.U., (2012). Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. *J. Infect. Dev. Ctries.* 6(3), 251-255.

Konishi, K., Saito, N., Shoji, E., Takeda, H., Kato, M., Asaka, M. (2007). *Helicobacter pylori*: longer survival in deep ground water and seawater than in a nutrient- rich environment. *APMIS.* 115,1285–1291. doi:10.1111/j.1600-0643.2007.00594.x.

Krumbiegel, P., Lehmann, I., Alfreider, A., Fritz, G.J., Boeckler, D., Rolle-Kampzyk, U., Richter, M., Jorks, S., Muller, L., Richter, M.W., Herbarth, O. (2004). *Helicobacter pylori* determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings. *Isotop. Environ. Health Stud.* 40, 75-80.

Kusters, J.G., Vliet, A.H.M.V., Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3), 449–490.

## L

---

Langford, B. (2005). The Private Sector and Growth in Fragile States: a Literature Review. Londres.: Department for International Development, United Kingdom.

Pecq, J.B. y Paoletti, C. (1996). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal. Biochem,* 17, 100-107

Lee, A. M., Squirrell, D. J., Leslie, D. L., Brown, T. (2004). Homogeneous fluorescent chemistries for Real-Time PCR. Real-Time an essential guide (ed. By K. Edwards, J. Logan, N. Saunders), pp. 31-70. Horizon Bioscience, London.

Leja, M., Axon, A., Brenner, H., (2016). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 21, S1,3-7.

Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, Article 258.

Li, C., Musich P.R., Ha, T., Ferguson, Jr.D.A., Patel, N.R., Chi, D.S., Thomas, E. (1995). High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J. Clin. Pathol.* 4(8), 662-666. doi:10.1136/jcp.48.7.662.

Linke, S., Lenz, J., Gemein, S., Exner, M., Gebel, J. (2010). Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *Inter. J. Hyg. Environ. Health.* 213: 176–182.

Lisle, J.T., Smith, J.J., Edwards, D.D., McFeters, G.A. (2004). Occurrence of Microbial Indicators and *Clostridium perfringens* in Wastewater, Water Column Samples, Sediments, Drinking Water, and Weddell Seal Feces Collected at McMurdo Station, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 7269–7276.

Lofgren, J.L., Whary, M.T., Ge, Z., Muthupalani, S., Taylor, N.S., Mobley, M., Potter, A., Varro, A., Eibach, D., Suerbaum, S., Wang, T.C., Fox, J.G. (2011). Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia; 140(1):210-20. doi: 10.1053/j.gastro.2010.09.048.

Lu, Y., Redlinger, T.E., Avitivia, R., Galindo, A., Goodman, K., (2002). Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3), 1436-1439.

Lu, J.J., Perng, C.L., Shyu, R.Y., Chen, C.H., Lou, Q., Chong, S.K.F., Lee, C.H. (1999). Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J. Clin. Microbiol.* 37(3), 772–774.

## M

---

Mapstone, N.P., Lynch, D.A., Lewis, F.A., Axon, A.T., Tompkins, D.S., Dixon, M.F., Quirke, P. (1993). Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol.* 46, 540- 543. doi:10.1136/jcp.46.6.540.

Marchini, A., Massari, P., Manetti, R., Olivieri, R. (1994). Optimized conditions for the fermentation of *Helicobacter pylori* and production of vacuolating cytotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 55–60.

Marshall, B.J., Warren, J.R. (1983). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* I, 1311-1315.

Marshall B. 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin. Med.* 2(2),147-152.

Martínez-Carrillo, D.N., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., Ilades Aguiar, B., Román-Román, A., Fernández-Tilapa, G. (2014). Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Rev Gastroenterol Mex.* 79(4), 220-8. DOI: 10.1016/j.rgmx.2014.10.003.

Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Ponce-de-León, S., Calva, J.J., Rojo-Callejas, F., Castillo-Rojas, G. (2005). Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the Mexico City metropolitan area water supply system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9), 5129–5137. doi:10.1128/AEM.71.9.5129–5137.2005.

Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Calva, J. J. (2001). *Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City. *Wat. Sci. Tech.* 43(12), 93-98.

McClain, M.S., Beckett, A.C., Cover, T.L. (2017). *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins.* 9(316), 1-17. doi: 10.3390/toxins9100316

McDaniels, A.E., Wymer, L., Rankin, C., Haugland, R. (2005). Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Wat. Res.* 39, 4808–4816.

McEgan, R., Rodrigues, C.A.P., Sbodio, A., Suslow, T.V., Goodridge, L.D., Danyluk, M.D. (2012). Detection of *Salmonella* spp. from large volumes of water by modified Moore swabs and tangential flow filtration. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 88-94.

McKillip, J.L., Drake, M.A. (2004). Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food Prot.* 54, 969-979

Ministerio del Medio Ambiente. Decreto 1594 de 1984. Disponible en: Sitio Web [http:// www.minambiente.gov.co/](http://www.minambiente.gov.co/).

Ministerio de Salud. Resolución 2115 de 2007. Sitio web <http://www.minsalud.gov.co/>.

Moncayo, J.I., Santacruz, J.J., Álvarez, A.L., Franco, B., López, M.A., Ángel, A., Gallego, M.L., Serrano, H. (2006). Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Médica*. 37(3). <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/446/1059>.

Montero-Campos, V., Arias-Cordero, S., Valdés-Rodríguez, B., Jarquín-Cordero, M., (2015). Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* by Real Time PCR in Drinking Water—Environmental and Public Health Risk Significance. *Open. J. Med. Microbiol.* 5, 118-127. <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2015.53015>.

Moore, R.A., Kureishi, A., Wong, S., Bryan, L.E. (1993). Categorization of clinical isolates of *Helicobacter pylori* on the basis of restriction digest analysis of polymerase chain reaction-amplified *ureC* genes. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1334-1335.

Moreno, Y., Ferrús, M.A. (2012). Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter*, 17: 327-332.

Moreno, M., Piqueres, P., Alonso, J.L., Jiménez, A., González, A., Ferrús, M.A. (2007). Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Wat. Res.* 41, 3490 – 3496.

Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A., Hernández, J. (2003a). Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Wat. Res.* 37, 2251–2256.

Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J.L., Ferrús, M.A., Hernández, M., Hernández, J., (2003b). Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2), 1181–1186.

Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. (2016). DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Res. Microbiol.* 167, 29-34.

Morgan, D.R., Mathewson, J.J., Freedman R., Kraft, W.G. (1990). Evaluation of a selective enrichment technique for the isolation of *Campylobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett.* 1,54(1-3), 303-306.

Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Bio. Techn.* 24, 954-962

Mosane, T.W., Malope, B.I., Ratshikhopha, M.E., Hiss, D.C., Sitas F. (2004). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* IgG antibodies in South African mothers and their children. *Eur. J. Gastroenterol. Hepathol.* 16(1):113-114.

Moter, A., Göbel, U.B. (2000). Fluorescent in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 41, 85-112.

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 262: 56-65.

Murray, R.G., Stackebrand, E. (1995). Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. *Inter. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 45, 186-187.

## N

---

National Research Council of the National Academics- NRC. (2006). Committee on fluoride in drinking water, board on environmental studies and toxicology. Division on Earth and Life Studies. Washington D.C. Disponible en: <http://www.nap.edu>.

Navarro, J., Perea, A., Pineda, J., Díez, O., Mercado, M., Trespalacios, A. (2007). Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *H. pylori*. *Univ. Scientiarum.* 12, 79-86.

Nayak, A.K., Rose, J.B., (2007). Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR® green. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1931-1941.

Nazarenko, I., Bhatnagar, S.K., Hohman, R.J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 25, 2516-2521.

Nilsson, H., Blom, J., Al-Soud, W., Ljungh, A., Andersen, L., Wadström, T. (2002). Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(1), 11–19.

Nilsson, H.O., Aleljung, P., Nilsson, I., Tyszkiewicz, T., Wadström, T., (1996). Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in human stools. *J. Microbiol. Meth.* 27(1), 73-79.

Nouraié, M., Latifi-Navid, S., Rezvan, H., Radmard, A.R., Maghsudlu, M., Zaer-Rezaii, H., Amini, S., Siavoshi, F., Malekzadeh, R. (2009). Childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. *Helicobacter*. 14, 40–46.

## O

---

Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M. (2001). The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 91, 373-379.

Ogura, M., Mitsuhahi, M. (1994). Screening method for a large quantity of polymerase chain reaction products by measuring YOYO-1 fluorescence on 96-well polypropylene plates. *Anal. Biochem.* 218, 458-459

Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D., Bianciardi, S., Rappuoli, R., Bayeli, P.F. (1993). Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J. Clin. Microbiol.* 31, 160–162.

Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E., Ugelstad, J. and Uhlen, M. (1994). Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 43-54.

Organización Mundial de la Salud - OMS. (2011). Guías para la Calidad del Agua Potable, 3a edición. Consultado en sitio web: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/gdwq3rev/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3rev/es/).

Organización Panamericana de la Salud - OPS/WHO. (2010). Procedimientos para la búsqueda de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales. Consultado en: [http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Muestreo\\_ambiental\\_V\\_cholerae.pdf?ua=1](http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Muestreo_ambiental_V_cholerae.pdf?ua=1).

Orta de Velásquez, M.T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodríguez, B., Román Román, P.I. (2016). Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environ. Techn.* 8, 39. DOI: 10.1080/09593330.2016.1210680

Ottemann K.M., Lowenthal A.C. (2002). *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* 70(4),1984-1990.

Owen R.J. (1993). *Helicobacter*-species classification and identification. *British Medical Bulletin*. 54, 17-30.

## P

---

Palomino Camargo, C., Tomé Boschian, E. (2012). *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. *An. Venez. Nutr.* 25(2), 85 – 93.

Park, S.R., Mackay, W.G., Reid, D.C. (2001). *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res.* 35, 1624-1626.

Payment, P., Franco, E. (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8), 2418-2424.

Percival, S.L., Suleman, L. (2014). Biofilms and *Helicobacter pylori*: Dissemination and persistence within the environment and host. *World J. Gastroint. Pathophys.* 5(3), 122-132.

Percival, S.L., Chalmers, R.M., Embrey, M., Hunter, P.R., Sellwood, J., Wyn-Jones, P. (2004). *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier Academic Press, London.

Piqueres, P., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. (2006). A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. *Res Microbiol* 6, 157, 345-349.

Plonka, M., Targosz, A., Brzozowski, T. (2014). Can drinking water serve as a potential reservoir of *Helicobacter pylori*? Evidence for water contamination by *Helicobacter pylori*. Cap. 3. Trends in *Helicobacter pylori* Infection. <http://dx.doi.org/10.5772/57568>.

Poms, R.E., Tatini, S.R. (2001). Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4°C. *Inter. J. Food Microbiol.* 63, 281–286.

Poms, R.E., (1997). Evaluation of Conditions for Recovery of *Helicobacter pylori* from Foods and their Survival in Ready-to- Center and a grant from the Austrian Department of Eat Foods. M.S. Thesis, University of Minnesota.

---

**Q**

---

Queralt, N., Araujo, R. (2007). Analysis of the Survival of *H. pylori* within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques. *Microbial Ecology*. 54, 771–777.

Queralt, N., Bartolomé, R., Araujo, R. (2005). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J. Appl. Microbiol.* 98, 889–895.

Quiroga, A.J., Cittelly, D.M., Bravo, M.M. (2005). Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica*. 25, 325-334.

---

**R**

---

Rahimi, E., Kheirabadi, E.K. (2012). Detection of *Helicobacter pylori* in bovine, buffalo, camel, ovine, and caprine milk in Iran. *Foodborne Pathog. Diseases*. 9(5),453-456.

Rai, K.R., Rai, S.K., Bhatt, D.R., Kurokuwa, M., Ono, K., Magar, D.T. (2012). Study of medically important *Vibrios* in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med. College J. NMCJ*. 14(3), 212-215. PMID:24047018.

Ranjbar, R., Khamesipour, F., Jonaidi-Jafari, N., Rahimi, E. (2016). *Helicobacter pylori* isolated from Iranian drinking water: *vacA*, *cagA*, *iceA*, *oipA* and *babA2* genotype status and antimicrobial resistance properties. *FEBS open Bio*. 6, 433-441. doi:10.1002/2211-5463.12054.

Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Hosseini, M.E., Atherton, J.C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 133, 926-936.

Ribas, F., Bernal, A., Perramón, J. (2000). Elimination of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, turbidity and particles in a drinking water treatment plant with clarification and double filtration. *Water Science Technol.* 41, 203-211.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154-160.

Rodriguez, R., 2011. Use of fluorescence *in situ* hybridization technique to visualize microorganisms. *Salud UIS.* 43 (3), 307-316.

Rune, T., Nielsen, P.S., Jensen, T.H. (2006). Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA Journal.* 11, 1745-1748.

Ryan, M., Hamilton, K., Hamilton, M., Haas, C.N. (2014). Evaluating the Potential for a *Helicobacter pylori* Drinking Water Guideline. *Risk Analysis.* 34(9), 1651-1992. DOI: 10.1111/risa.12190.

## S

---

Saito, N., Konishi, K., Sato, F., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T. (2003). Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J Infec.* 46, 49–55.

Santiago, P., Moreno, Y., Ferrús, M. A. (2015). Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter.* 20, 252–259. ISSN 1523-5378.

Sarem, M., Corti, R. (2016). Rol de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en la infección y la recrudescencia. *Gastroenterología y Hepatología.* 39(1), 28-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.04.009>.

Sasaki, K., Tajiri, Y., Sata, M., Fujii, Y., Matsubara, F., Zhao, M., Shimizu, S., Toyonaga, A., Tanikawa, K. (1999). *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 275-279.

Sen, K., Schable, N.A., Lye, D.J. (2007). Development of an internal control for evaluation and standardization of a quantitative PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22), 7380–7387.

Shahamat, M., Alem, N., Asalkhou, M., Hamedi, N., Alem, N., Morshedizadeh, K., Alem, M. (2006). IgM antibody response to antigens prepared from vegetative and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Experim. Molec. Pathol.* 81, 171–175. doi:10.1016/j.yexmp.2006.04.003.

Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, C., Kessel, M., 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (4), 1231–1235.

Shahamat, M., Mai, U.E.H., Paszko-Kolva, C., Colwell, R.R. (1991). Effect of selected antibiotics on *Helicobacter pylori*, C-10, p. 343. Abstr. 91st Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Shakoor, S., Beg, M.A., Mahmood, S.G., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., Ali, F., Visvesvara, G.S., Zafar, A. (2011). Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerging Infectious Diseases.* 17, 2.

She, F., Lin, J., Liu, J., Huang, C., Su, D. (2003). Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World. J. Gastroenterol.* 159(3), 516-520.

Shen, Z., Xu, S., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Pena, J.A., Modlin, I. M., Kidd, M., Fox, J.G. (2005). A novel enterohepatic *Helicobacter* species '*Helicobacter mastomyrinus*' isolated from the liver and intestine of rodents. *Helicobacter* 10, 59–70.

Sicinschi, L., Correa, P., Bravo, L.E., Schneider, B.G. (2003). Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J. Microbiol. Methods.* 52, 197–207. [PubMed: 12459240].

Simpson, D.A.C., Geeney, S., Boyle, C., Stitt, A.W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Mol. Vis.* 6, 178-183

Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M.E., Holt, J. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2, Williams-Wilkins, Baltimore, USA.

C. M. Solomon, C.M., Alexander, J.A., Glibert, P.M. (2007). Measuring urease activity in aquatic environmental samples. *Limnol. Oceanogr.: Meth.* 5, 280-288.

Song, Q., Zirstein, W., Swaminathan, B., Gold, B. (2001). Pretreatment with urea-hydrochloric acid enhances the isolation of *Helicobacter pylori* from contaminated specimens. *J. Clin. Microbio.* 39 (5), 1967–1968.

Stevenson, T.H., Castillo, A., Lucia, L.M., Acuff G.R. (2000). Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett. Appl. Microbiol.* 30(3), 192–196.

Sugimoto, M., Wu, J.Y., Abudayyeh, S., Hoffman, J., Brahem, H., Al-Khatib, K., Yamaoka, Y., Graham, D.Y. (2009). Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 47(3), 738–742.

## T

---

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad.* 2(2), 70-78. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx).

Terebiznik, M.R., Vàsquez, C.L., Torbicki, K., Banks, D., Wang, T., Hong, W., Blanke, S.R., Colombo, M.I., Jones, N.L. (2006). *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 74(12), 6599-6614.

Thomas, A. (2011). Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ. Sci. Technol.* 45(3), 860-869.

Tirodimos, I., Bobos, M., Kazakos, E., Haidich, A.B., Dardavessis, T., Kostopoulos, I., Arvanitidou, M., (2014). [Molecular detection of \*Helicobacter pylori\* in a large Mediterranean river, by direct viable count fluorescent in situ hybridization \(DVC-FISH\).](#) *J. Water. Health.* 12(4), 868-873. doi: 10.2166/wh.2014.171.

Travis, P.B., Goodman, K.J., O'Rourke, K.M., Groves, F.D., Sinha, D., Nicholas, J.S., VanDerslice, J., Lackland, D., Mena, K.D. (2010). The association of drinking water quality and sewage disposal with *Helicobacter pylori* incidence in infants: the potential role of water-borne transmission. *J. Water Health.* 8(1), 192–203. doi: 10.2166/wh.2009.040.

Trust, T.J., Logan, S.M., Gustafson, C.E., Rmaniuk, P.J., Kim, N.W., Chan, V.L., Ragan, M.A., Guerry, P., Gutell, R.R. (1994). Phylogenetic and molecular characterization of a 23S rRNA gene positions the genus *Campylobacter* in the epsilon subdivision of the Proteobacteria and shows that the presence of transcribed spacers is common in *Campylobacter* spp. *J. Bacteriol.* 176, 4597-4609.

Twing, K.I., Kirchman, D.L., Campbell, B.J. (2011). Temporal study of *Helicobacter pylori* presence in coastal freshwater, estuary and marine waters. *Water Res.* 45, 1897-1905.

## U

---

U. S. Environmental Protection Agency – USEPA. (2015). Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination. Draft Contaminant Candidate List 4-CCL 4. Consultado en: <https://www.epa.gov/ccl/draft-contaminant-candidate-list-4-ccl-4>.

U. S. Environmental Protection Agency – USEPA. (2006). Drinking Water Requirements for States and Public Water Systems. Consultado en: <https://www.epa.gov/dwreginfo/ground-water-rule>.

U. S. Environmental Protection Agency – USEPA. (2003). Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination. Draft Contaminant Candidate List 1-CCL 1. Consultado en: <https://www.epa.gov/ccl/draft-contaminant-candidate-list-1-ccl-1#microbial-list>.

## V

---

Vale, F., Vitor J. (2010). Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *Inter. J. Food Microbiol.* 138, 1–12.

Van Lieverloo, J., Blokker, E., Medema, G. (2007). Quantitative microbial risk assessment of distributed drinking water using faecal indicator incidence and concentrations. *J. Water Health.* 5, 131-149.

Vandamme, P. (2000). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: Nachamkin, I. and Blaser, M. J. (eds.). *Campylobacter*, 2nd Edition. ASM Press, Washinton, DC. pp. 3-26.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., de Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *Internal. J. System. Evolut. Microbiol.* 41, 88-103.

Velázquez, M., Feirtag, J.M. (1999). *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Internat. J. Food Microbiol.* 53, 95–104.

Vesga, F.J., Moreno, Y., Ferrús, M.A., Campos, C., Trespalacios, A.A. (2018). Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques. *Intern. J. Hyg. Environ. Health.* 221, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.010>.

## W

Walsh, E.J., Moran, A.P. (1997). Influence of medium composition on the growth and antigen expression of *Helicobacter pylori*. *J. Appl. Microbiol.* 83, 67–75.

Wang, X.F., Wang, K.X. (2004). Cloning and expression of *vacA* gene fragment of *Helicobacter pylori* with coccoid form. *J. Chin Med Assoc.* 67, 549-556.

Wang, X., Sturegard, E., Rugar, R., Nilsson, H-O., Aleljung, P.A., Carlen, B., Willen, R., Wadstrom, T. (1997). Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 46, 657-663.

Warren, J.R., Marshall, B.J. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1, 1273-1275.

Watson, C.L., Owen, R.J., Said, B., Lai, S., Lee, J.V., Surman-Lee, S., Nichols, G. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *J. Appl. Microbiol.* 97, 690–698. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02360.x.

Wen, S., Moss, S.F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.* 282, 1 -8.

Westblom, T., Bhatt, B. (1999). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. In: Currents Topics in Microbiology and Immunology. N° 241” Gastroduodenal Disease and *Helicobacter pylori*: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. Eds. Westblom, Czinn, Nedrud. Springer. R.W Compans, Atlanta/Georgia. P. 215-236.

Wilhelm, J., Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.* 4, 1120-1128.

Wilson, I., (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *App. Environ. Microbiol.* 63(10), 3741-3751.

Wingender, J., Flemming, H.C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 214(6), 417-23. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.05.009.

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, T P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Bio. Techniques*. 22, 130-138.

Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Review*. 51, 221-271

World Health Organization (WHO). (2014). Water Safety in Distribution Systems. Consultado en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/WSH-distribution\\_system-20141114.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/WSH-distribution_system-20141114.pdf).

World Health Organization (WHO). (2004). Safe Piped Water. *Managing Microbial Water Quality in Piped Distribution Systems*. TJ International (Ltd), Padstow, Cornwall, UK, pp. 168.

## Y

---

Yakub, G.P., Stadterman-Knauer, K.L. (2004). Separation of pathogenic organisms from the environment. *methods in molecular biology*, vol. 268: Public Health Microbiology: Methods and Protocols. Edited by: J. F. T. Spencer and A. L. Ragout Spencer © Humana Press Inc., Totowa, NJ. USA.

Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K., Graham, D.Y. (1998). Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter*. 2(4), 241-253.

Yáñez, M.A., Barberá, V.M., Soria, E., Catalán, V. (2009). Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. *J. Appl. Microbiol.* 107, 416–424.

# ANEXOS

## ANEXO I: Medios de Cultivo

### 1. Agar Brucella Suplementado

#### 1.1. Agar Brucella BBL™ (Becton Dickinson)

Composición g/L:

Componente	Concentración (Litro <sup>-1</sup> )
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	10 g
Tejido animal digerido por enzimas pépticas	10 g
Dextrosa	1 g
Extracto de levadura	2 g
Cloruro sódico	5 g
Bisulfito sódico	0.1 g
Agar bacteriológico	15 g

Resuspender 38.7g en 900 mL de agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 min. Una vez esterilizado el agar Brucella, se deja enfriar hasta  $\pm 50^\circ\text{C}$  y se adiciona 5% Sangre de caballo defibrinada (45 mL), 0,2% de DENT Suplemento (Oxoid, Inglaterra) (2 mL) y 0,4% de Isovitalax (Becton Dickinson BBL™) (3.6 mL), mezclar bien y servir en placas de Petri plásticas estériles.

#### 1.2. DENT - Suplemento selectivo para *H. pylori* (Oxoid SR0147, Inglaterra).

Presentación por viales. 1 vial es suficiente para 500mL de medio.

Composición por vial	1 vial	1 L
Vancomicina	5.0 mg	10 mg
Trimetropina	2.5 mg	5 mg
Cefsulodina	2.5 mg	5 mg
Anfotericina B	2.5 mg	5 mg

### 1.3. Isovitalex (Becton Dickinson BBL™)

Composición:

Componente	Concentración (Litro <sup>-1</sup> )
Vitamina B12	0,01 g
L-glutamina	10,0 g
Adenina	1,0 g
Clorhidrato de guanina	0,03 g
Acido p-aminobenzoico	0,013 g
Dinucleótido de nicotinamida adenina	0,25 g
Pirofosfato de tiamina	0,1 g
Nitrato férrico	0,02 g
Clorhidrato de tiamina	0,003 g
Clorhidrato de L-cisteína	25,9 g
L-cistina	1,1 g
Dextrosa	100,0 g

### 2. Agar HP (diseñado por Degnan *et al.*, 2003)

Composición:

Componente	Concentración (Litro <sup>-1</sup> )
Agar bacteriológico*	15 g
Peptona especial*	10 g
Extracto de carne*	5 g
Extracto de levadura*	5 g
Cloruro de sodio*	5 g
Rojo de fenol*	100 mg
Ácido clorhídrico 1N (HCl)**	0.8 mL
Polimixina B**	3.500 U
Anfotericina B**	7.5 mg
Vancomicina**	10 mg
Trimetoprima**	5 mg

Cefsulodina**	5 mg
Urea**	600 mg

\*Estos componentes fueron mezclados junto con el agua (1L) y autoclavados por 20 minutos a 121°C. y fue atemperado a 50°C. los antibióticos\*\* y la urea\*\* fueron adicionados asépticamente en agitación constante. Finalmente, se adicionó el HCl para obtener un pH final de 5.7 a 45°C y de 6.0 a 22°C. distribuir el medio en cajas de Petri.

### 3. Caldo Brucella Suplementado BBL™

*Caldo Brucella BBL™ (Becton Dickinson)*

Composición:

Componente	Concentración (Litro <sup>-1</sup> )
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	10 g
Peptona	10 g
Tejido animal digerido por enzimas pépticas	10 g
Dextrosa	1 g
Extracto de levadura	2 g
L-Arginina	1 g
Piruvato Sódico	1 g
Hemina	5 g
Vitamina K1	0.5 g
Cloruro sódico	5 g
Bisulfito sódico	0.1 g

Resuspender 28 g en 1L de agua destilada y esterilizar a 121°C, 15 min. Una vez esterilizado el caldo Brucella, se deja enfriar hasta  $\pm 50^\circ\text{C}$  y se adiciona 0,2% de DENT Suplemento (Oxoid, Inglaterra) (2 mL/L) y 0,4% de Isovitalex (Becton Dickinson BBL™) (4 mL/L), mezclar bien y alicuotar en frascos estériles.

#### 4. Caldo Urea

Resuspender 1 g de urea (Merck, Alemania, CAS 57-13-6) en 10 mL de agua destilada estéril. A parte resuspender 0.001g de rojo de fenol (Merck, Alemania, CAS 143-74-8) en 10mL de agua destilada estéril.

Para 10 mL de solución de urea, agregar 1mL de la solución de rojo de fenol. (Rojo de fenol al 0.01%).

pH 6.9 Amarillo.

pH 8.2 Rojo.

#### 5. Agar Chromocult® para coliformes (Merck, Alemania, VM665 126 502)

Composición:

Componente	Concentración (Litro <sup>-1</sup> )
Peptona	3 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.7 g
Piruvato de sodio	1 g
Sorbitol	1 g
Triptófano	1 g
Tergitol® 7	0.15 g
6-Chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopironidasa	0.2 g
5-Bromo-4-cloro-3-indoxyl-D-ácido glucurónico	0.1 g
Isopropil-beta-D-tiogalacto pironidasa	0.1 g
Agar-agar	10

Resuspender 26.5 g en 1000 mL de agua destilada estéril. Calentar bajo agitación suave hasta que el medio de cultivo se haya disuelto completamente. No autoclavar ni sobrecalentar el medio. Dejar enfriar entre 45-50 °C y agregar el

suplemento selectivo *E. coli* / Coliformes de marca Merck (Numeral 8.2) en condiciones asépticas. Servir en cajas de petri pequeñas 60x15mm. Almacenar las cajas servidas a 4 ( $\pm$ 2) °C protegido de la luz.

### **Suplemento selectivo *E. coli* / coliformes**

El suplemento *E. coli* / coliformes-selectivo (Merck, Alemania) es una mezcla de dos inhibidores en forma liofilizadas. Compuesto por: 2.5mg de vancomicina y 2.5mg de cefsulodina.

Resuspender el liofilizado agregando 2 mL de agua destilada estéril en el frasco original en condiciones asépticas. Agregar el contenido de un frasco de suplemento a 500 mL de medio de cultivo ChromoCult coliform agar listo para servir.

### **6. Agar SPS - Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (Merck, Alemania, VM687 735 524)**

Composición:

<b>Componente</b>	<b>Concentración (Litro<sup>-1</sup>)</b>
Extracto de levadura	10 g
Hidrolizado pancreático de caseína	15 g
Citrato férrico	0.5 g
Sulfito sódico	0.5 g
Polimixina B sulfato	0,01 g
Sulfadiazina	0.12 g
Tioglicolato sódico	0.1 g
Agar	13.9 g

Resuspender 39.7 g del medio en 1 litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver por calentamiento y agitación constante. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

---

**ANEXO II: Reactivos y Soluciones****ANEXO II.1. Aislamiento y concentración****PBS 1X**

<b>Componente</b>	<b>Concentración L<sup>-1</sup></b>
NaCl	8.1 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KCl	0.22 g
Agua destilada	1000 mL

Primero disolver los fosfatos y luego el cloruro sódico. Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar por filtración 0.45 µm o 0.2 µm.

Posteriormente esterilizar a 115°C, 20 min. Conservar a 4°C, uso en frío.

---

## ANEXO II.2. Soluciones y reactivos para FISH

### Fijación de muestras

- ✓ PBS 1X.
- ✓ Paraformaldehído (PFA) (Panreac, ref. 141451).

Calentar 65 mL de agua destilada hasta 60°C. Añadir 4 g de paraformaldehído (Panreac, ref. 141451). Adicionar unas gotas de NaOH (5M) para ayudar a la disolución del polvo. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 mL de PBS 3X. Ajustar el pH a 7.2 con ClH. Eliminar los posibles cristales mediante filtración y conservar a 4°C durante un máximo de 48 horas, o a -20°C durante varias semanas.

- ✓ Etanol absoluto (Sigma-Aldrich, ref. 24102).

### Gelatinización de los portaobjetos

---

#### Componente

Gelatina bacteriológica (Panreac, ref. 403902)	0,1%
Sulfato potásico cromato (Sigma-Aldrich, ref. C-5926)	0,01%

---

Calentar previamente el agua destilada hasta 60°C. Añadir la gelatina y la sal de cromato y mantener calentando en agitación hasta la completa disolución. Atemperar la solución a unos 45°C y sumergir en ella los portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld, ref. 9782100). Escurrir los portaobjetos y dejar secar al aire. Secar al aire.

### Deshidratación de las muestras

- ✓ Etanol 50%: 100 mL Etanol absoluto + 100 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

- ✓ Etanol 80%: 160 mL Etanol absoluto + 40 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- ✓ Etanol 100 %: Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente y a 4°C para fijación.

### Sondas (50 ng/μL)

- ✓ Sonda para Eubacterias: EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III (Tib Molbiol ®, Alemania).
- ✓ Sonda para *Helicobacter pylori*: HPY-LNA (Exiqon, USA).

Diluir en agua MilliQ la solución madre de sondas marcadas con fluorocromos hasta una concentración 50 ng/μl. Tanto la solución madre como la de trabajo se almacenan a -20°C en oscuridad.

### Tampón de hibridación

Componente	Cantidad
NaCl 5M	360 μl (0,9M)
HCl-Tris 1M	40 μl (20 mM)
SDS 10%	2 μl (0,01%)
Formamida (SIGMA F-7503)	X μl (0-50%)
Agua milliQ	completar hasta 2 ml

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 ml y agitar.

### Tampón de lavado

Componente	Cantidad
NaCl 5M*	(9000-100 $\mu$ l)
HCl-Tris 1M	1000 $\mu$ l
SDS 10%	50 $\mu$ l
EDTA 0,5M**	500 $\mu$ l
Agua milliQ	completar hasta 50 ml

\* La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación.

\*\* Solo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

%Formamida (Tampón de hibridación)	$\mu$ L de NaCl 0.5M (Tampón de lavado)
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
35	700
40	460

### 1. NaCl 5M

Componente	Cantidad
Cloruro de sódico (NaCl)	292.2g
Agua destilada	1000 mL

Disolver el NaCl en 800 mL de agua destilada y ajustar el volumen hasta 1 litro. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

**2. Tris-HCl 1M (pH 8.0)**

Componente	Cantidad
Tris Base	121.1g
HCl	42 mL
Agua destilada	Hasta 1000 mL

Pesar el Tris Base y añadir a 800 mL de agua destilada. Añadir 42 mL de HCl concentrado y completar hasta 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

**3. SDS 10%**

Componente	Cantidad
SDS	10g
Agua destilada	Hasta 1000 mL

Esterilizar por filtración.

**4. EDTA 0.5M**

Componente	Cantidad
EDTA	186.1 g
Agua destilada	Hasta 1000 mL

Pesar el EDTA y añadir a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Completar hasta 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

**Visualización al microscopio**

- ✓ Antirrefractante (FluoroGuard™ Antifade Reagent, Bio-Rad).

---

### ANEXO II.3. Reactivos y soluciones para PCR y qPCR

#### Extracción de DNA

Aguas Crudas y Potables: “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen, USA).

#### Tampón TE (pH 8)

✚ Tris- HCl M10 mM

✚ EDTA 1 mM

#### Reacción de amplificación para PCR

GoTaq® Green Master Mix (Promega, M7123, USA).

Compuesta por: tampón de reacción verde (pH 8.5) que contiene la DNA Polimerasa, dATP 400µM, dGTP 400µM, dCTP 400µM, dTTP 400µM y MgCl<sub>2</sub> 3mM.

#### Reacción de amplificación para qPCR

LightCycler® FastStar DNA Master, SYBR Green I (Roche Diagnostics, Ref. 12 239 264 001, Alemania).

Compuesta por: FastStart Taq ADN Polimerasa, tampón de reaccion, dNTP mix (con dUTP en lugar de dTTP), colorante SYBR Green I, solución stock de MgCl<sub>2</sub> 50mM y agua grado PCR.

#### Iniciadores para *Helicobacter pylori*:

✚ ureAF / ureAR (Invitrogen, USA).

✚ cagAF / cagAR (Invitrogen, USA).

✚ vacAs1/s2F / vacAs1/s2R (Invitrogen, USA).

✚ vacAm1/m2F / vacAm1/m2 (Invitrogen, USA).

- ✚ glmMF / glmMR (Invitrogen, USA).
- ✚ VacAR/ VacAF (Invitrogen, USA).
- ✚ VacAR/ VacAF (Tib Molbiol®, Alemania).

### Electroforesis de ADN en gel de agarosa

#### ✓ Agarosa

UltraPure™, Agarose. Resuelve fragmentos de 100 a más de 30Kb, Electroendosmosis EEO de 0.09-0.13-mr. (Invitrogen™, Ref: 16500-100, USA).

#### ✓ Tampón TAE 50X (solución stock): Tris-Acético-EDTA

Componente	Cantidad
Tris-Base	24.2 g
Ácido acético glacial	5.71 mL
EDTA 0,5M	10 mL
Agua desionizada	Completar a 1000mL

#### ✓ Tampón TAE 1X

Componente	Cantidad
TAE 50X	20 mL
Agua desionizada	Completar a 980mL

Para la preparación del gel de agarosa: Pesar la cantidad deseada de agarosa (20mg/mL) y disolver con el tampón TAE 1X. Llevar a ebullición, agitar, atemperar a 50° C y adicionar el reactivo para teñir el gel, el volumen depende del tamaño del gel que se elabore (1  $\mu$ L / 100mL). Verter en la bandeja molde para el gel.

#### ✓ Tampón de carga

6X Loading Dye Solution (Fermentas, España, ref. R0611).

Composición 10mL:

Componente	Volumen
Azul de bromofenol 1%	2.5 mL
Ficoll	2.5 mL
EDTA (0.5M)	1mL
Agua Ultrapura	4mL

pH = 8

✓ **Marcador de pesos moleculares**

- ✚ **TrackIt™** 100 bp DNA Ladder. (1µg/µl). Composición: Tris-HCl (pH 7.5) 10mM, EDTA (pH 8.0) 10mM, XCFF 0.06%, tartracina 0.6%, y glicerol 5% (Invitrogen™, USA).
- ✚ **GeneRuler™** 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, España, ref. SM0323).

✓ **Reactivos para teñir geles**

- ✚ **SYBR™ Safe™** al 0.02% (SYBR® Safe DNA gel stain, 10.000X en agua, Invitrogen™, S33102, USA).
- ✚ **GelRed** (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X en agua) (0.5 µl/10mL) (Biotium, USA).

**ANEXO III. Detección de *H. pylori* mediante cultivo, FISH, PCR y qPCR en muestras de agua cruda y potable.**

**Tabla 38.** Resultados de los análisis para la detección de *H. pylori* en el agua cruda y potable de la PTAP 1.

Muestra	AGUA CRUDA							AGUA POTABLE						
	Cultivo			Muestras directas				Cultivo			Muestras directas			
	Test BQ	FISH	Sec	PCR det	PCR gen <i>vacA</i>	qPCR UG/mL	Sec	Test BQ	FISH	Sec	PCR det	PCR gen <i>vacA</i>	qPCR UG/R	Sec
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
3	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	2,12x10 <sup>3</sup>	Pos*
4	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	4,91x10 <sup>1</sup>	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
5	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	1,61x10	Pos*
7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
8	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	5,77	Pos*
10	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
11	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	6,31x10 <sup>1</sup>	Pos*
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	3,99x10 <sup>1</sup>	Pos*
13	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	1,28x10 <sup>1</sup>	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	1,07x10 <sup>2</sup>	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
17	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)

18	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
22	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
24	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	6,85x10 <sup>1</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	8,32	Pos*
25	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
27	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
28	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
38	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
39	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
42	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
43	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)

44	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
45	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
46	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
47	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
49	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
51	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
52	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
53	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>TP</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>34</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

Test BQ: Pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y oxidasa); FISH: hibridación in situ con sondas fluorescentes; Sec: secuenciación por Sanger; PCR det: genes *ureA* y *glmM*; UG/mL: unidades genómicas / mililitro; UG/R: unidades genómicas / reacción; Pos: positivo (presencia de *H. pylori*); Pos\*:  $\geq 97\%$  homología para *H. pylori*; (-): negativo (Ausencia de *H. pylori*); TP: total muestras positivas

**Tabla 39.** Resultados de los análisis para la detección de *H. pylori* en el agua cruda y potable de la PTAP 2.

MUESTRA	AGUA CRUDA							AGUA POTABLE						
	Cultivo			Muestras directas				Cultivo			Muestras directas			
	Test BQ	FISH	Sec	PCR det	PCR gen vacA	qPCR UG/mL	Sec	Test BQ	FISH	Sec	PCR det	PCR gen vacA	qPCR UG/R	Sec
1	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
3	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
4	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
5	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
7	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
8	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos
10	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
12	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
13	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	3,13x10 <sup>1</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
16	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
17	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
18	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
19	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	(-)	(-)

20	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	3,84x10 <sup>1</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
24	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	4,69x10 <sup>2</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
25	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	(-)	(-)
26	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
27	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
30	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
32	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
38	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
39	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
40	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
42	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
43	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
44	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

46	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
47	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
49	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
50	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
51	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
52	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
53	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
TP	36	8	8	18	17	14	14	32	8	8	20	17	15	15

Test BQ: Pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y oxidasa); FISH: hibridación in situ con sondas fluorescentes; Sec: secuenciación por Sanger; PCR det: genes *ureA* y *glmM*; UG/mL: unidades genómicas / mililitro; UG/R: unidades genómicas / reacción; Pos: positivo (presencia de *H. pylori*); Pos\*:  $\geq 97\%$  homología para *H. pylori*; (-): negativo (Ausencia de *H. pylori*); TP: total muestras positivas; NM: no muestra.

**Tabla 40.** Resultados de los análisis para la detección de *H. pylori* en el agua cruda y potable de la PTAP 3.

MUESTRA	AGUA CRUDA							AGUA POTABLE						
	Cultivo			Muestras directas				Cultivo			Muestras directas			
	Test BQ	FISH	Sec	PCR det	PCR gen vacA	qPCR UG/mL	Sec	Test BQ	FISH	Sec	PCR det	PCR gen vacA	qPCR UG/R	Sec
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	3,41x10 <sup>1</sup>	Pos*
3	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	1,73x10 <sup>2</sup>	Pos*
4	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	2,47x10 <sup>2</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
5	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	7,22x10 <sup>1</sup>	Pos*
7	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	1,79x10 <sup>1</sup>	Pos*
8	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	4,10x10 <sup>1</sup>	Pos*
10	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	3,02x10 <sup>1</sup>	Pos*
11	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*
12	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	1,51x10 <sup>2</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	4,0x10 <sup>1</sup>	Pos*
17	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
18	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)
19	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

21	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	7,78x10 <sup>1</sup>	Pos*	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
22	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
23	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)
24	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	1,61x10 <sup>1</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	Pos	(-)	(-)	(-)
25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	6,06	Pos*
26	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	Pos	Pos	Pos	Pos*
27	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
28	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	7,22x10 <sup>1</sup>	Pos*	Pos	(-)	(-)	Pos	Pos	6,57x10 <sup>1</sup>	Pos*
32	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)
35	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
38	(-)	(-)	(-)	Pos	Pos	1,05x10 <sup>2</sup>	Pos*	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)
39	Pos	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
42	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
43	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
44	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
46	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

47	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
48	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
49	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
50	Pos	Pos	Pos*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
51	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
52	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Pos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
53	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
TP	32	12	12	26	15	13	13	32	12	12	19	12	12	12

Test BQ: Pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y oxidasa); FISH: hibridación in situ con sondas fluorescentes; Sec: secuenciación por Sanger; PCR det: genes *ureA* y *glmM*; UG/mL: unidades genómicas / mililitro; UG/R: unidades genómicas / reacción; Pos: positivo (presencia de *H. pylori*); Pos\*:  $\geq 97\%$  homología para *H. pylori*; (-): negativo (Ausencia de *H. pylori*); TP: total muestras positivas; NM: no muestra.

**ANEXO IV. Resultados de los análisis de los indicadores de contaminación fecal en las muestras de agua potable y cruda de las plantas de tratamiento.**

**Tabla 41.** Resultados de los análisis de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en agua cruda y potable de la PTAP 1.

Muestra	Fecha			Clima	Indicadores de contaminación fecal evaluados					
					Coliformes totales (ufc/mL)		<i>E. coli</i> (ufc/mL)		Esporas de <i>Clostridium</i> (ufc/mL)	
	Año	Mes	Día		Cruda	Potable	Cruda	Potable	Cruda	Potable
1	2015	Julio	21	Lluvia	2,8E+03	0	8,0E+02	0	1,0E+01	0
2	2015	Julio	28	Lluvia	3,7E+03	0	7,0E+02	0	3,8E+02	0
3	2015	Agosto	4	Seco	1,9E+03	0	3,0E+02	0	1,2E+02	0
4	2015	Agosto	11	Lluvia	3,4E+03	0	1,4E+03	0	3,5E+02	0
5	2015	Agosto	18	Lluvia	2,5E+03	0	4,0E+02	0	2,8E+02	0
6	2015	Agosto	25	Lluvia	2,0E+03	0	4,0E+02	0	4,0E+01	0
7	2015	Septiembre	1	Lluvia	7,9E+03	0	1,7E+03	0	3,0E+02	0
8	2015	Septiembre	8	Seco	7,3E+03	0	1,3E+03	0	4,4E+02	0
9	2015	Septiembre	15	Seco	7,0E+03	0	7,0E+02	0	4,0E+02	0
10	2015	Septiembre	22	Seco	5,7E+03	0	1,3E+03	0	6,0E+02	0
11	2015	Septiembre	29	Seco	6,3E+03	0	1,2E+03	0	5,0E+02	0
12	2015	Octubre	6	Seco	9,0E+03	0	7,0E+02	0	2,2E+02	0
13	2015	Octubre	13	Lluvia	2,7E+04	0	2,0E+01	0	6,6E+02	0
14	2015	Octubre	20	Seco	2,0E+04	0	1,0E+03	0	2,2E+02	0
15	2015	Octubre	27	Lluvia	9,8E+03	0	1,7E+03	0	5,2E+02	0
16	2015	Noviembre	3	Seco	5,7E+04	0	2,1E+03	0	4,4E+02	0
17	2015	Noviembre	10	Lluvia	5,4E+03	0	5,0E+02	0	9,0E+02	0

18	2015	Noviembre	17	Seco	1,0E+04	0	4,0E+02	0	5,5E+03	0
19	2015	Noviembre	24	Lluvia	3,6E+04	0	4,0E+02	0	2,6E+02	0
20	2015	Diciembre	1	Seco	6,8E+03	0	7,0E+02	0	1,7E+02	0
21	2015	Diciembre	9	Seco	5,4E+03	0	5,0E+02	0	3,2E+02	0
22	2015	Diciembre	15	Seco	7,2E+03	0	6,0E+02	0	2,2E+02	0
23	2015	Diciembre	22	Seco	8,9E+03	0	2,3E+02	0	2,5E+02	0
24	2015	Diciembre	29	Seco	5,6E+03	0	2,3E+02	0	2,8E+02	0
25	2016	Enero	19	Seco	4,1E+03	0	5,0E+02	0	3,6E+02	0
26	2016	Enero	26	Seco	6,9E+03	0	6,0E+02	0	4,6E+02	0
27	2016	Febrero	2	Seco	5,5E+03	0	3,0E+02	0	3,5E+02	0
28	2016	Febrero	9	Seco	3,4E+03	0	3,0E+02	0	3,5E+02	0
29	2016	Febrero	16	Seco	4,5E+03	0	5,0E+02	0	1,8E+02	0
30	2016	Febrero	23	Lluvia	7,8E+03	0	6,1E+02	0	2,9E+02	0
31	2016	Marzo	1	Seco	1,2E+04	0	3,0E+03	0	2,6E+02	0
32	2016	Marzo	8	Seco	2,0E+03	0	6,0E+02	0	2,0E+02	0
33	2016	Marzo	15	Lluvia	9,5E+03	0	6,2E+02	0	4,1E+02	0
34	2016	Marzo	22	Seco	7,7E+03	0	6,0E+02	0	1,8E+02	0
35	2016	Marzo	29	Seco	8,9E+03	0	1,5E+03	0	2,3E+02	0
36	2016	Abril	5	Lluvia	7,2E+03	0	1,5E+03	0	1,8E+02	0
37	2016	Abril	12	Lluvia	4,0E+04	0	1,2E+02	0	5,4E+01	0
38	2016	Abril	19	Lluvia	7,1E+03	0	3,0E+02	0	1,4E+02	0
39	2016	Abril	26	Lluvia	3,2E+03	0	9,0E+02	0	8,0E+00	0
40	2016	Mayo	3	Lluvia	1,2E+04	0	1,9E+03	0	8,0E+00	0
41	2016	Mayo	10	Lluvia	5,4E+03	0	1,3E+03	0	2,3E+02	0
42	2016	Mayo	17	Lluvia	3,9E+03	0	1,3E+03	0	2,3E+02	0
43	2016	Mayo	24	Lluvia	8,9E+03	0	1,0E+03	0	2,8E+02	0
44	2016	Mayo	31	Lluvia	1,6E+04	0	8,0E+02	0	5,9E+02	0

<b>45</b>	2016	Junio	7	Lluvia	3,4E+03	0	1,3E+03	0	5,2E+02	0
<b>46</b>	2016	Junio	14	Lluvia	3,5E+03	0	4,0E+02	0	6,0E+02	0
<b>47</b>	2016	Junio	21	Lluvia	5,1E+03	0	9,0E+02	0	2,7E+02	0
<b>48</b>	2016	Junio	28	Seco	3,5E+03	0	1,2E+03	0	5,5E+02	0
<b>49</b>	2016	Julio	5	Lluvia	1,1E+03	0	6,0E+02	0	4,3E+02	0
<b>50</b>	2016	Julio	12	Lluvia	2,4E+03	0	6,0E+02	0	2,8E+02	0
<b>51</b>	2016	Julio	19	Lluvia	8,2E+03	0	1,2E+03	0	3,8E+02	0
<b>52</b>	2016	Julio	26	Seco	4,2E+03	0	7,0E+02	0	6,0E+02	0
<b>53</b>	2016	Agosto	2	Lluvia	5,2E+03	0	8,0E+02	0	2,7E+02	0
<b>Promedio</b>					8,9E+03	0,0E+00	8,5E+02	0,0E+00	4,2E+02	0,0E+00
<b>Máximo</b>					5,7E+04	0,0E+00	3,0E+03	0,0E+00	5,5E+03	0,0E+00
<b>Mínimo</b>					1,1E+03	0,0E+00	2,0E+01	0,0E+00	8,0E+00	0,0E+00
<b>DS</b>					±0,33	±0,0	±0,35	±0,0	±0,47	±0,0

Cruda: agua cruda; Potable: agua potable; ufc/mL: unidades formadoras de colonias / 100 mililitros; DS: desviación estándar.

**Tabla 42.** Resultados de los análisis de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en agua cruda y potable de la PTAP 2.

Muestra	Fecha			Clima	Indicadores de contaminación fecal evaluados					
	Año	Mes	Día		Coliformes totales (ufc/mL)		<i>E. coli</i> (ufc/mL)		Esporas de <i>Clostridium</i> (ufc/mL)	
					Cruda	Potable	Cruda	Potable	Cruda	Potable
1	2015	Julio	21	Lluvia	3,3E+02	0	1,1E+02	0	3,0E+01	0
2	2015	Julio	28	Lluvia	1,8E+02	0	4,8E+01	0	2,0E+01	0
3	2015	Agosto	4	Seco	6,4E+01	0	8,0E+00	0	2,6E+01	0
4	2015	Agosto	11	Lluvia	4,0E+01	0	4,0E+00	0	1,4E+01	0
5	2015	Agosto	18	Lluvia	1,0E+02	0	5,6E+01	0	2,2E+01	0
6	2015	Agosto	25	Lluvia	1,3E+02	0	4,0E+01	0	1,6E+01	0
7	2015	Septiembre	1	Lluvia	2,5E+02	0	1,3E+02	0	1,0E+02	0
8	2015	Septiembre	8	Seco	4,5E+02	0	2,7E+02	0	5,2E+01	0
9	2015	Septiembre	15	Seco	3,2E+02	0	1,3E+02	0	1,0E+02	0
10	2015	Septiembre	22	Seco	NM	NM	NM	NM	NM	NM
11	2015	Septiembre	29	Seco	1,1E+02	0	6,0E+00	0	9,2E+01	0
12	2015	Octubre	6	Seco	2,0E+02	0	5,2E+01	0	3,0E+01	0
13	2015	Octubre	13	Lluvia	2,2E+02	0	2,0E+01	0	9,2E+01	0
14	2015	Octubre	20	Seco	1,3E+03	0	2,0E+00	0	2,0E+00	0
15	2015	Octubre	27	Lluvia	8,0E+02	0	2,0E+01	0	9,6E+01	0
16	2015	Noviembre	3	Seco	6,1E+02	0	2,0E+00	0	4,0E+01	0
17	2015	Noviembre	10	Lluvia	2,2E+02	0	3,8E+01	0	1,2E+02	0
18	2015	Noviembre	17	Seco	1,7E+02	0	1,6E+01	0	1,0E+01	0
19	2015	Noviembre	24	Lluvia	4,5E+02	0	3,0E+02	0	6,2E+01	0
20	2015	Diciembre	1	Seco	5,2E+01	0	1,0E+01	0	6,0E+00	0
21	2015	Diciembre	9	Seco	4,0E+02	0	7,6E+01	0	6,0E+01	0
22	2015	Diciembre	15	Seco	2,2E+02	0	2,6E+01	0	1,3E+02	0

<b>23</b>	2015	Diciembre	22	Seco	6,0E+02	0	5,0E+01	0	5,4E+01	0
<b>24</b>	2015	Diciembre	29	Seco	1,8E+02	0	2,0E+00	0	8,8E+01	0
<b>25</b>	2016	Enero	19	Seco	1,8E+02	0	2,0E+00	0	8,8E+01	0
<b>26</b>	2016	Enero	26	Seco	4,5E+02	0	4,0E+01	0	4,6E+01	0
<b>27</b>	2016	Febrero	2	Seco	2,0E+02	0	2,0E+00	0	2,0E+01	0
<b>28</b>	2016	Febrero	9	Seco	2,6E+02	0	2,0E+00	0	1,4E+01	0
<b>29</b>	2016	Febrero	16	Seco	1,2E+02	0	2,0E+00	0	8,0E+00	0
<b>30</b>	2016	Febrero	23	Lluvia	3,8E+01	0	2,0E+00	0	6,0E+00	0
<b>31</b>	2016	Marzo	1	Seco	6,4E+01	0	6,0E+00	0	4,0E+00	0
<b>32</b>	2016	Marzo	8	Seco	9,0E+01	0	1,8E+01	0	1,2E+01	0
<b>33</b>	2016	Marzo	15	Lluvia	6,4E+01	0	1,8E+01	0	1,0E+01	0
<b>34</b>	2016	Marzo	22	Seco	7,2E+02	0	6,0E+00	0	1,2E+01	0
<b>35</b>	2016	Marzo	29	Seco	1,8E+03	0	1,2E+02	0	4,0E+00	0
<b>36</b>	2016	Abril	5	Lluvia	5,1E+03	0	7,0E+01	0	4,0E+00	0
<b>37</b>	2016	Abril	12	Lluvia	7,2E+03	0	7,0E+02	0	5,7E+02	0
<b>38</b>	2016	Abril	19	Lluvia	4,1E+02	0	4,8E+01	0	9,2E+01	0
<b>39</b>	2016	Abril	26	Lluvia	1,3E+02	0	2,4E+01	0	1,0E+02	0
<b>40</b>	2016	Mayo	3	Lluvia	6,5E+02	0	3,4E+01	0	7,0E+01	0
<b>41</b>	2016	Mayo	10	Lluvia	1,5E+02	0	1,6E+01	0	3,8E+01	0
<b>42</b>	2016	Mayo	17	Lluvia	5,2E+02	0	2,2E+02	0	1,5E+02	0
<b>43</b>	2016	Mayo	24	Lluvia	2,6E+02	0	3,6E+01	0	6,4E+01	0
<b>44</b>	2016	Mayo	31	Lluvia	2,9E+02	0	6,0E+01	0	2,8E+01	0
<b>45</b>	2016	Junio	7	Lluvia	2,0E+02	0	1,3E+02	0	4,8E+01	0
<b>46</b>	2016	Junio	14	Lluvia	4,2E+02	0	6,0E+01	0	5,6E+01	0
<b>47</b>	2016	Junio	21	Lluvia	4,8E+02	0	1,4E+02	0	2,8E+01	0
<b>48</b>	2016	Junio	28	Seco	2,7E+02	0	1,5E+02	0	1,0E+02	0
<b>49</b>	2016	Julio	5	Lluvia	1,1E+02	0	2,2E+01	0	3,0E+01	0

<b>50</b>	2016	Julio	12	Lluvia	2,2E+02	0	1,2E+02	0	9,2E+01	0
<b>51</b>	2016	Julio	19	Lluvia	7,0E+01	0	4,0E+01	0	2,6E+01	0
<b>52</b>	2016	Julio	26	Seco	2,9E+02	0	2,8E+01	0	4,4E+01	0
<b>53</b>	2016	Agosto	2	Lluvia	2,4E+02	0	5,4E+01	0	5,2E+01	0
<b>Promedio</b>					5,5E+02	0,0E+00	6,9E+01	0,0E+00	5,9E+01	0,0E+00
<b>Máximo</b>					7,2E+03	0,0E+00	7,0E+02	0,0E+00	5,7E+02	0,0E+00
<b>Mínimo</b>					3,8E+01	0,0E+00	2,0E+00	0,0E+00	2,0E+00	0,0E+00
<b>DS</b>					±0,46	±0,0	±0,67	±0,0	±0,49	±0,0

Cruda: agua cruda; Potable: agua potable; ufc/mL: unidades formadoras de colonias / 100 mililitros; NM: no muestra; DS: desviación estándar.

**Tabla 43.** Resultados de los análisis de la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal en agua cruda y potable de la PTAP 3.

Muestra	Fecha			Clima	Indicadores de contaminación fecal evaluados					
	Año	Mes	Día		Coliformes totales (ufc/mL)		<i>E. coli</i> (ufc/mL)		Esporas de <i>Clostridium</i> (ufc/mL)	
					Cruda	Potable	Cruda	Potable	Cruda	Potable
1	2015	Julio	21	Lluvia	3,5E+02	0	3,0E+01	0	3,8E+02	0
2	2015	Julio	28	Lluvia	2,0E+02	0	3,2E+01	0	4,0E+00	0
3	2015	Agosto	4	Seco	1,8E+02	0	2,4E+01	0	4,0E+00	0
4	2015	Agosto	11	Lluvia	2,4E+01	0	2,4E+01	0	8,0E+00	0
5	2015	Agosto	18	Lluvia	1,5E+02	0	2,0E+01	0	2,2E+01	0
6	2015	Agosto	25	Lluvia	2,2E+02	0	6,6E+01	0	5,0E+00	0
7	2015	Septiembre	1	Lluvia	1,3E+02	0	4,0E+01	0	8,0E+00	0
8	2015	Septiembre	8	Seco	3,8E+02	0	1,2E+02	0	5,1E+01	0
9	2015	Septiembre	15	Seco	5,1E+02	0	3,6E+01	0	5,2E+01	0
10	2015	Septiembre	22	Seco	1,9E+02	0	6,2E+01	0	3,2E+01	0
11	2015	Septiembre	29	Seco	1,1E+02	0	2,0E+00	0	1,4E+01	0
12	2015	Octubre	6	Seco	4,5E+02	0	2,0E+00	0	4,0E+00	0
13	2015	Octubre	13	Lluvia	2,5E+02	0	4,0E+00	0	2,0E+00	0
14	2015	Octubre	20	Seco	1,8E+02	0	4,0E+00	0	5,4E+01	0
15	2015	Octubre	27	Lluvia	1,7E+03	0	2,0E+00	0	1,0E+00	0
16	2015	Noviembre	3	Seco	4,1E+02	0	6,0E+01	0	1,0E+00	0
17	2015	Noviembre	10	Lluvia	NM	NM	NM	NM	NM	NM
18	2015	Noviembre	17	Seco	4,3E+02	0	2,0E+00	0	2,0E+00	0
19	2015	Noviembre	24	Lluvia	4,4E+02	0	2,0E+00	0	2,0E+00	0
20	2015	Diciembre	1	Seco	3,3E+02	0	2,0E+00	0	3,0E+00	0
21	2015	Diciembre	9	Seco	1,6E+02	0	2,0E+00	0	1,0E+00	0
22	2015	Diciembre	15	Seco	4,3E+02	0	2,0E+00	0	2,0E+00	0

23	2015	Diciembre	22	Seco	2,1E+02	0	4,0E+00	0	1,0E+00	0
24	2015	Diciembre	29	Seco	1,4E+02	0	2,0E+00	0	3,0E+00	0
25	2016	Enero	19	Seco	1,2E+02	0	2,0E+00	0	1,0E+00	0
26	2016	Enero	26	Seco	7,6E+01	0	2,0E+00	0	1,0E+00	0
27	2016	Febrero	2	Seco	5,4E+01	0	2,0E+00	0	2,0E+00	0
28	2016	Febrero	9	Seco	2,0E+02	0	2,0E+00	0	1,5E+01	0
29	2016	Febrero	16	Seco	5,5E+02	0	2,0E+00	0	8,0E+00	0
30	2016	Febrero	23	Lluvia	8,0E+02	0	1,2E+01	0	2,0E+00	0
31	2016	Marzo	1	Seco	2,0E+02	0	1,2E+01	0	2,0E+00	0
32	2016	Marzo	8	Seco	3,8E+02	0	1,4E+02	0	2,0E+00	0
33	2016	Marzo	15	Lluvia	5,1E+02	0	2,4E+01	0	3,0E+00	0
34	2016	Marzo	22	Seco	1,6E+03	0	2,0E+01	0	3,0E+00	0
35	2016	Marzo	29	Seco	4,6E+02	0	1,8E+01	0	1,0E+00	0
36	2016	Abril	5	Lluvia	1,1E+03	0	1,0E+02	0	8,0E+00	0
37	2016	Abril	12	Lluvia	2,0E+03	0	1,2E+02	0	5,4E+01	0
38	2016	Abril	19	Lluvia	8,5E+02	0	2,0E+01	0	6,0E+00	0
39	2016	Abril	26	Lluvia	6,8E+02	0	2,0E+00	0	2,6E+01	0
40	2016	Mayo	3	Lluvia	4,0E+02	0	3,2E+01	0	6,0E+00	0
41	2016	Mayo	10	Lluvia	2,4E+02	0	2,0E+00	0	8,0E+00	0
42	2016	Mayo	17	Lluvia	1,8E+02	0	1,0E+02	0	2,4E+01	0
43	2016	Mayo	24	Lluvia	1,8E+02	0	1,6E+01	0	1,2E+01	0
44	2016	Mayo	31	Lluvia	1,7E+02	0	3,2E+01	0	1,8E+01	0
45	2016	Junio	7	Lluvia	1,6E+02	0	1,6E+01	0	8,0E+00	0
46	2016	Junio	14	Lluvia	1,1E+02	0	1,8E+01	0	6,8E+01	0
47	2016	Junio	21	Lluvia	NM	NM	NM	NM	NM	NM
48	2016	Junio	28	Seco	NM	NM	NM	NM	NM	NM
49	2016	Julio	5	Lluvia	3,4E+01	0	1,6E+01	0	1,0E+01	0

<b>50</b>	2016	Julio	12	Lluvia	1,8E+02	0	8,0E+01	0	8,0E+00	0
<b>51</b>	2016	Julio	19	Lluvia	9,2E+01	0	3,2E+01	0	1,2E+01	0
<b>52</b>	2016	Julio	26	Seco	7,0E+01	0	1,6E+01	0	4,0E+00	0
<b>53</b>	2016	Agosto	2	Lluvia	6,0E+01	0	2,0E+01	0	4,0E+00	0
<b>Promedio</b>					3,8E+02	0,0E+00	2,8E+01	0,0E+00	1,9E+01	0,0E+00
<b>Máximo</b>					2,0E+03	0,0E+00	1,4E+02	0,0E+00	3,8E+02	0,0E+00
<b>Mínimo</b>					2,4E+01	0,0E+00	2,0E+00	0,0E+00	1,0E+00	0,0E+00
<b>DS</b>					±0,41	±0,0	±0,63	±0,0	±0,59	±0,0

Cruda: agua cruda; Potable: agua potable; ufc/mL: unidades formadoras de colonias / 100 mililitros; NM: no muestra; DS: desviación estándar.

**ANEXO V. Resultados análisis fisicoquímicos de las muestras de agua potable y cruda de las plantas de tratamiento.**
**Tabla 44.** Resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos en agua cruda y potable de la PTAP 1.

Muestra	Fecha			Parámetros fisicoquímicos evaluados							
				Turbidez (UNT)			Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )		pH		Cl <sub>2</sub> Libre (mg/L) potable
	Año	Mes	Día	Cruda	Potable	%Rend	Cruda	Potable	Cruda	Potable	
1	2015	Julio	21	24,0	0,13	99,5	80,0	120,0	6,8	6,73	1,65
2	2015	Julio	28	23,0	0,12	99,5	100,0	150,0	7,0	6,82	1,77
3	2015	Agosto	4	36,0	0,16	99,6	80,0	130,0	6,8	6,79	1,74
4	2015	Agosto	11	25,0	0,17	99,3	70,0	110,0	6,8	6,83	1,65
5	2015	Agosto	18	33,0	0,18	99,4	80,0	125,0	6,7	6,83	1,75
6	2015	Agosto	25	26,0	0,16	99,4	80,0	110,0	7,0	6,83	1,76
7	2015	Septiembre	1	23,0	0,15	99,3	70,0	110,0	6,9	6,80	1,77
8	2015	Septiembre	8	22,0	0,17	99,2	70,0	110,0	6,8	6,78	1,63
9	2015	Septiembre	15	21,0	0,10	99,5	80,0	110,0	6,8	6,72	1,66
10	2015	Septiembre	22	20,0	0,14	99,3	80,0	110,0	7,0	6,85	1,64
11	2015	Septiembre	29	23,0	0,13	99,4	90,0	120,0	6,9	6,85	1,62
12	2015	Octubre	6	19,0	0,14	99,3	90,0	120,0	7,0	6,82	1,68
13	2015	Octubre	13	21,0	0,11	99,5	100,0	130,0	6,9	6,73	1,68
14	2015	Octubre	20	23,0	0,15	99,3	90,0	110,0	7,2	6,74	1,61
15	2015	Octubre	27	16,0	0,17	98,9	90,0	120,0	7,2	6,79	1,68
16	2015	Noviembre	3	17,0	0,11	99,3	90,0	110,0	7,1	6,72	1,64
17	2015	Noviembre	10	22,0	0,16	99,3	110,0	140,0	6,9	6,72	1,62
18	2015	Noviembre	17	14,0	0,14	99,0	100,0	120,0	7,0	6,77	1,61
19	2015	Noviembre	24	19,0	0,16	99,2	110,0	140,0	7,0	6,84	1,78
20	2015	Diciembre	1	16,0	0,13	99,2	100,0	120,0	7,1	6,88	1,6

21	2015	Diciembre	9	22,0	0,16	99,3	90,0	120,0	7,0	6,85	1,77
22	2015	Diciembre	15	16,0	0,14	99,1	100,0	120,0	7,2	6,89	1,69
23	2015	Diciembre	22	18,0	0,12	99,3	90,0	110	7,0	6,91	1,64
24	2015	Diciembre	29	16,0	0,15	99,1	100,0	110	7,02	6,92	1,64
25	2016	Enero	19	19,0	0,10	99,5	80,0	110	6,80	6,81	1,64
26	2016	Enero	26	18,0	0,10	99,4	80,0	100	6,90	6,76	1,82
27	2016	Febrero	2	18,0	0,14	99,2	80,0	110	6,80	6,85	1,77
28	2016	Febrero	9	18,0	0,11	99,4	70,0	100	6,80	6,77	1,73
29	2016	Febrero	16	20,0	0,13	99,4	80,0	100	6,90	6,74	1,78
30	2016	Febrero	23	17,0	0,14	99,2	80,0	100	6,90	6,7	1,79
31	2016	Marzo	1	17,0	0,11	99,4	80,0	100	6,80	6,69	1,91
32	2016	Marzo	8	17,0	0,15	99,1	80,0	110	6,90	6,77	1,83
33	2016	Marzo	15	19,0	0,1	99,5	70,0	100	6,70	6,79	1,91
34	2016	Marzo	22	17,0	0,13	99,2	60,0	90	6,80	6,78	1,92
35	2016	Marzo	29	19,0	0,16	99,2	60,0	80	6,80	6,9	1,82
36	2016	Abril	5	17,0	0,14	99,2	70,0	90	6,80	6,8	1,88
37	2016	Abril	12	19,0	0,12	99,4	65,0	100	6,70	6,86	1,98
38	2016	Abril	19	14,0	0,15	98,9	90,0	120	6,90	6,82	1,85
39	2016	Abril	26	12,0	0,14	98,8	80,0	110	6,80	6,74	1,87
40	2016	Mayo	3	11,0	0,17	98,5	80,0	120	6,80	6,76	1,82
41	2016	Mayo	10	12,0	0,15	98,8	80,0	120	6,90	6,72	1,89
42	2016	Mayo	17	14,0	0,15	98,9	90,0	120	6,90	6,74	1,62
43	2016	Mayo	24	13,0	0,13	99,0	85,0	120	6,90	6,74	1,73
44	2016	Mayo	31	17,0	0,17	99,0	90,0	140	6,80	6,71	1,74
45	2016	Junio	7	16,0	0,14	99,1	100,0	145	6,80	6,79	1,72
46	2016	Junio	14	15,0	0,12	99,2	100,0	150	6,90	6,76	1,76
47	2016	Junio	21	19,0	0,14	99,3	80,0	115	6,80	6,7	1,69

<b>48</b>	2016	Junio	28	19,0	0,19	99,0	95,0	150	6,90	6,74	1,83
<b>49</b>	2016	Julio	5	31,0	0,14	99,5	80,0	140	6,70	6,73	1,68
<b>50</b>	2016	Julio	12	22,0	0,19	99,1	90,0	150	6,80	6,96	1,78
<b>51</b>	2016	Julio	19	20,0	0,18	99,1	100,0	140	6,80	6,78	1,68
<b>52</b>	2016	Julio	26	21,0	0,17	99,2	80,0	120	6,90	6,8	1,67
<b>53</b>	2016	Agosto	2	23,0	0,16	99,3	100,0	140	7,00	6,83	1,68
<b>Promedio</b>				19,4	0,1	99,2	85,2	118,2	6,9	6,8	1,7
<b>Máximo</b>				36,0	0,2	99,6	110,0	150,0	7,2	7,0	2,0
<b>Mínimo</b>				11,0	0,1	98,5	60,0	80,0	6,7	6,7	1,6
<b>DS</b>				4,9	0,0	0,2	11,9	16,6	0,1	0,1	0,1

Cruda: agua cruda; Potable: agua potable; UNT: unidades nefelométricas de turbidez; %Rend: porcentaje de remoción de la turbidez;  $\mu\text{S/cm}$ : microSiemens / centímetro;  $\text{Cl}_2$  Libre: cloro libre residual; mg/L  $\text{Cl}_2$ : miligramos de Cloro / Litro; DS: desviación estándar.

**Tabla 45.** Resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos en agua cruda y potable de la PTAP 2.

Muestra	Fecha			Parámetros fisicoquímicos evaluados							
				Turbidez (UNT)			Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )		pH		Cl <sub>2</sub> Libre (mg/L) potable
	Año	Mes	Día	Cruda	Potable	%Rend	Cruda	Potable	Cruda	Potable	
1	2015	Julio	21	6,59	0,24	96,4	18,8	60,1	6,79	7,09	1,22
2	2015	Julio	28	9,20	0,48	94,8	17,1	57,7	6,29	6,99	1,08
3	2015	Agosto	4	10,50	0,21	98,0	18,6	62,1	6,39	7,35	1,21
4	2015	Agosto	11	6,99	0,46	93,4	20,1	62,8	6,39	7,34	1,12
5	2015	Agosto	18	8,88	0,39	95,6	16,6	62,9	6,45	7,20	1,14
6	2015	Agosto	25	9,25	0,54	94,2	8,1	59,1	6,39	6,77	1,34
7	2015	Septiembre	1	7,89	0,17	97,8	19,4	72,8	6,40	7,18	1,91
8	2015	Septiembre	8	12,60	0,19	98,5	19,2	52,9	6,41	6,91	1,49
9	2015	Septiembre	15	11,40	0,42	96,3	0,0	52,3	0,00	6,74	1,17
10	2015	Septiembre	22	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
11	2015	Septiembre	29	5,50	0,32	94,2	20,6	50,1	6,25	7,05	1,1
12	2015	Octubre	6	6,80	0,27	96,0	22,1	56,7	6,46	6,95	1,12
13	2015	Octubre	13	7,10	0,28	96,1	23,5	63,2	6,66	6,97	1,44
14	2015	Octubre	20	5,64	0,43	92,4	23,8	49,9	6,27	6,40	1,3
15	2015	Octubre	27	5,07	0,41	91,9	23,7	59,6	6,70	7,48	1,23
16	2015	Noviembre	3	6,73	0,23	96,6	24,0	68,3	6,31	7,27	1,2
17	2015	Noviembre	10	5,63	0,18	96,8	22,4	68,4	6,37	6,96	1,02
18	2015	Noviembre	17	3,81	0,34	91,1	21,2	63,1	6,41	7,08	1,25
19	2015	Noviembre	24	18,50	0,32	98,3	17,4	71,0	6,25	7,63	1,45
20	2015	Diciembre	1	6,45	0,26	96,0	18,5	67,6	6,30	7,42	1,1
21	2015	Diciembre	9	6,32	0,37	94,1	17,1	50,7	6,24	7,10	0,79
22	2015	Diciembre	15	4,94	0,34	93,1	18,2	40,6	6,20	7,06	1,21

<b>23</b>	2015	Diciembre	22	5,2	0,27	94,8	18,2	56,4	6,25	7,26	1,25
<b>24</b>	2015	Diciembre	29	4,6	0,18	96,1	19,7	58,6	6,25	7,12	1,45
<b>25</b>	2016	Enero	19	5,04	0,17	96,6	21,8	77,2	6,26	7,09	1,35
<b>26</b>	2016	Enero	26	5,28	0,22	95,8	22,4	74,2	6,37	6,94	1,03
<b>27</b>	2016	Febrero	2	6,89	0,22	96,8	23,1	70,8	6,34	6,6	0,94
<b>28</b>	2016	Febrero	9	4,94	0,25	94,9	24	66,2	6,49	6,68	0,91
<b>29</b>	2016	Febrero	16	4,55	0,2	95,6	24,6	54,4	6,44	6,68	1,52
<b>30</b>	2016	Febrero	23	4,6	0,2	95,7	25,2	62,3	6,55	7,01	1,8
<b>31</b>	2016	Marzo	1	4,41	0,16	96,4	25,5	68,3	6,37	6,85	1,63
<b>32</b>	2016	Marzo	8	5,68	0,14	97,5	26,5	78,1	6,46	7,11	1,13
<b>33</b>	2016	Marzo	15	4,2	0,27	93,6	26,9	88,8	6,42	7,35	1,32
<b>34</b>	2016	Marzo	22	4,36	0,3	93,1	27,7	85,1	6,47	7,5	1,04
<b>35</b>	2016	Marzo	29	4,36	0,17	96,1	27,9	87,2	6,52	6,65	1,48
<b>36</b>	2016	Abril	5	20,9	0,23	98,9	20,7	94,1	6,41	6,56	1,54
<b>37</b>	2016	Abril	12	8,41	0,27	96,8	21,7	93,4	6,32	6,79	1,18
<b>38</b>	2016	Abril	19	6,1	0,7	88,5	21,4	72,8	6,12	6,6	0,95
<b>39</b>	2016	Abril	26	5,11	0,82	84,0	26,2	88,4	6,22	6,52	1,15
<b>40</b>	2016	Mayo	3	6,14	0,17	97,2	24,5	79,2	6,31	6,79	1,45
<b>41</b>	2016	Mayo	10	5,47	0,19	96,5	21,8	65,1	6,34	6,95	1,16
<b>42</b>	2016	Mayo	17	6,72	0,18	97,3	15,5	79,9	6,24	6,72	1,39
<b>43</b>	2016	Mayo	24	5,8	0,15	97,4	18,7	66,2	6,35	7,81	1,67
<b>44</b>	2016	Mayo	31	16,2	0,2	98,8	19,3	65,8	6,47	6,89	1,49
<b>45</b>	2016	Junio	7	14,4	0,35	97,6	21,5	69,5	6,46	6,86	1,54
<b>46</b>	2016	Junio	14	6,52	0,2	96,9	17,6	65,4	6,23	7,59	1,43
<b>47</b>	2016	Junio	21	12,4	0,4	96,8	15,5	58,3	6,43	7,95	1,72
<b>48</b>	2016	Junio	28	8,36	0,14	98,3	16,8	66,4	6,62	7,32	1,66
<b>49</b>	2016	Julio	5	10,1	0,47	95,3	14,7	58,4	6,2	7,25	1,24

<b>50</b>	2016	Julio	12	47,1	0,23	99,5	20,8	84,9	6,29	7,44	1,52
<b>51</b>	2016	Julio	19	17	0,35	97,9	21,1	75,2	6,15	7,45	1,5
<b>52</b>	2016	Julio	26	11,8	0,28	97,6	19,6	41,4	6,35	6,89	1,36
<b>53</b>	2016	Agosto	2	8,88	0,22	97,5	20,2	67,2	6,59	7,79	1,05
<b>Promedio</b>				8,6	0,3	95,7	20,4	66,8	6,3	7,1	1,3
<b>Máximo</b>				47,1	0,8	99,5	27,9	94,1	6,8	8,0	1,9
<b>Mínimo</b>				3,8	0,1	84,0	0,0	40,6	0,0	6,4	0,8
<b>DS</b>				6,7	0,1	2,7	4,7	12,3	0,9	0,4	0,2

Cruda: agua cruda; Potable: agua potable; UNT: unidades nefelométricas de turbidez; %Rend: porcentaje de remoción de la turbidez;  $\mu\text{S/cm}$ : microSiemens / centímetro;  $\text{Cl}_2$  Libre: cloro libre residual; mg/L  $\text{Cl}_2$ : miligramos de Cloro / Litro; DS: desviación estándar; NM: no muestra.

**Tabla 46.** Resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos en agua cruda y potable de la PTAP 3.

Muestra	Fecha			Parámetros fisicoquímicos evaluados							
				Turbidez (UNT)			Conductividad (µS/cm)		pH		Cl <sub>2</sub> Libre (mg/L) potable
	Año	Mes	Día	Cruda	Potable	%Rend	Cruda	Potable	Cruda	Potable	
1	2015	Julio	21	2,1	0,35	83,6	50,0	60,0	6,84	6,63	1,82
2	2015	Julio	28	2,4	0,43	81,7	50,0	62,0	6,72	6,60	1,97
3	2015	Agosto	4	2,6	0,45	82,8	50,0	63,0	6,81	6,77	1,85
4	2015	Agosto	11	2,3	0,53	77,2	50,0	60,0	6,82	6,75	1,66
5	2015	Agosto	18	7,1	1,30	81,7	51,0	62,0	6,86	6,49	1,97
6	2015	Agosto	25	4,1	0,47	88,5	52,0	60,0	6,77	6,68	1,71
7	2015	Septiembre	1	2,4	0,48	80,3	52,0	60,0	6,88	6,76	1,66
8	2015	Septiembre	8	10,1	0,49	95,1	53,0	64,0	6,69	6,61	1,82
9	2015	Septiembre	15	5,7	0,48	91,6	54,0	66,0	6,68	6,79	1,65
10	2015	Septiembre	22	4,8	0,64	86,8	57,0	68,0	6,84	6,73	1,58
11	2015	Septiembre	29	7,3	0,42	94,3	60,0	73,0	6,79	6,55	1,56
12	2015	Octubre	6	2,0	0,55	73,0	29,0	38,0	6,89	6,61	1,53
13	2015	Octubre	13	1,6	0,40	75,2	29,0	34,0	6,80	6,50	1,55
14	2015	Octubre	20	1,73	0,56	67,6	29	37	6,97	6,72	1,85
15	2015	Octubre	27	1,48	0,61	58,8	30	38	6,97	6,68	1,66
16	2015	Noviembre	3	1,75	0,52	70,3	30	38	7,00	6,63	1,97
17	2015	Noviembre	10	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
18	2015	Noviembre	17	1,5	0,49	67,3	30	38	6,98	6,66	1,66
19	2015	Noviembre	24	1,79	0,51	71,5	30	38	6,86	6,57	1,82
20	2015	Diciembre	1	1,75	0,77	56,0	30	38	6,85	6,47	1,65
21	2015	Diciembre	9	2,31	0,52	77,5	30	38	6,85	6,55	1,58
22	2015	Diciembre	15	2,16	0,53	75,5	31	38	6,84	6,53	1,53

<b>23</b>	2015	Diciembre	22	1,83	0,48	73,8	30	38	6,68	6,58	1,61
<b>24</b>	2015	Diciembre	29	2,22	0,48	78,4	30	39	6,84	6,53	1,88
<b>25</b>	2016	Enero	19	2,88	0,6	79,2	94	76	6,66	6,51	2,00
<b>26</b>	2016	Enero	26	2,81	0,52	81,5	45	55	6,61	6,53	1,61
<b>27</b>	2016	Febrero	2	2,38	0,53	77,7	45	54	6,55	6,5	1,75
<b>28</b>	2016	Febrero	9	3,01	0,37	87,7	46	54	6,1	6,39	1,94
<b>29</b>	2016	Febrero	16	2,48	0,6	75,8	47	56	6,52	6,55	1,74
<b>30</b>	2016	Febrero	23	2,25	0,52	76,9	49	59	6,69	6,67	1,87
<b>31</b>	2016	Marzo	1	2,52	0,56	77,8	51	62	6,6	6,59	2
<b>32</b>	2016	Marzo	8	2,08	0,57	72,6	54	57	6,58	6,55	2
<b>33</b>	2016	Marzo	15	2,28	0,54	76,3	59	61	6,8	6,66	1,88
<b>34</b>	2016	Marzo	22	1,75	0,47	73,1	38	70	6,76	6,72	2
<b>35</b>	2016	Marzo	29	1,58	0,56	64,6	59	70	6,85	6,66	1,98
<b>36</b>	2016	Abril	5	27	0,68	97,5	62	78	6,74	6,44	1,72
<b>37</b>	2016	Abril	12	6,42	0,73	88,6	39	51	6,89	6,72	1,93
<b>38</b>	2016	Abril	19	4,97	0,94	81,1	35	49	6,87	6,66	1,89
<b>39</b>	2016	Abril	26	3,04	0,5	83,6	34	40	6,84	6,63	2
<b>40</b>	2016	Mayo	3	2,81	0,37	86,8	34	39	6,87	6,76	1,81
<b>41</b>	2016	Mayo	10	2,22	0,32	85,6	36	40	6,82	6,62	1,9
<b>42</b>	2016	Mayo	17	3,39	0,38	88,8	36	41	6,84	6,65	1,87
<b>43</b>	2016	Mayo	24	8,16	0,64	92,2	33	41	7,01	6,48	1,83
<b>44</b>	2016	Mayo	31	4,29	0,48	88,8	41	45	6,72	6,56	1,59
<b>45</b>	2016	Junio	7	2,81	0,28	90,0	42	45	6,89	6,55	1,88
<b>46</b>	2016	Junio	14	2,31	0,33	85,7	42	46	6,792	6,64	1,7
<b>47</b>	2016	Junio	21	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
<b>48</b>	2016	Junio	28	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
<b>49</b>	2016	Julio	5	3,02	0,43	85,8	35	47	7,26	6,93	1,98

<b>50</b>	2016	Julio	12	3,7	0,3	91,9	36	44	6,95	6,54	2,00
<b>51</b>	2016	Julio	19	2,85	0,5	82,5	36	44	7	6,68	2,00
<b>52</b>	2016	Julio	26	3,68	0,56	84,8	38	41	7,05	6,65	1,94
<b>53</b>	2016	Agosto	2	3,55	0,45	87,3	37	42	7,01	6,63	1,97
<b>Promedio</b>				3,7	0,5	80,6	42,8	51,1	6,8	6,6	1,8
<b>Máximo</b>				27,0	1,3	97,5	94,0	78,0	7,3	6,9	2,0
<b>Mínimo</b>				1,5	0,3	56,0	29,0	34,0	6,1	6,4	1,5
<b>DS</b>				3,8	0,2	9,0	12,5	12,3	0,2	0,1	0,2

Cruda: agua cruda; Potable: agua potable; UNT: unidades nefelométricas de turbidez; %Rend: porcentaje de remoción de la turbidez;  $\mu$ S/cm: microSiemens / centímetro; Cl<sub>2</sub> Libre: cloro libre residual; mg/L Cl<sub>2</sub>: miligramos de Cloro / Litro; DS: desviación estándar; DS: desviación estándar; NM: no muestra.

**ANEXO VI. Secuencias FASTA del gen *vacA* de las muestras y cultivos positivos de *H. pylori***

**>Seq1 [organism=Helicobacter pylori] *vacA* gen, partial sequence, isolated influent water sample 4-PTAP1**

```
CATCTGACGATTGCGCGTGGAGCCAGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCT
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAACC
GTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCT
GTTTTTGGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAG
CGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTATC
CTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGC
GCTTTGCCACAACCCGGTTGTGGCCAA
```

**>Seq2 [organism=Helicobacter pylori] *vacA* gen, partial sequence, isolated influent water sample 5- PTAP 1**

```
GCATCTGCATTCTCAGTACACTTGGCATTGGTGGTAGAGAAGCTTTATACCCTC
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAACCG
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTG
TTTTTGGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTATCC
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGC
CTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCAA
```

**>Seq3 [organism=Helicobacter pylori] *vacA* gen, partial sequence, isolated influent water sample 8- PTAP 1**

```
GGATCTGGGCGATTGCGTGTAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCC
TCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAAC
CGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTT
CTGTTTTTGGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTG
AGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTA
TCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCC
GCGCTTTGCCACAAACCTGTGTGCCAAT
```

**>Seq4 [organism=Helicobacter pylori] *vacA* gen, partial sequence, isolated influent water sample 13- PTAP 1**

```
CATCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG
TTTTTGGCGACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT
GCTCTTTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTT
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA
TGTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCAAGTGTGCCA
```

**>Seq5 [organism=Helicobacter pylori] *vacA* gen, partial sequence, isolated influent water sample 16- PTAP 1**

TATTCGTTGCGATTGCAATGAGCCAGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCC  
TCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTT  
CTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTG  
ACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTGCTTTTTAGCACCCAC  
TTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGA  
TAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCTGTGTGCCA

**>Seq6 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 21- PTAP 1**

CATCCTTTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCC  
TCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTT  
CTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTG  
ACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTGCTTTTTAGCACCCAC  
TTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGA  
TAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq7 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 24- PTAP 1**

GGAGCTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATACC  
CCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAAA  
CAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGT  
GCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCGGG  
CGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGCA  
CGATTAGAGTGGGAGGGTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGC  
ATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAAGCCGAGCGATGAAG

**>Seq8 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 39- PTAP 1**

AACTGAACTCTCTCTGGTCTCGCCTCTGTCCAATCAGAGATGAGCCAAATAAT  
ACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGAC  
AAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAAT  
AGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAAGCGAGCGAAAAAGC

**>Seq9 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 1- PTAP 2**

TTAGACGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCC  
TCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTT  
CTGTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTG  
AGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTGCCTGGTGTACTAGGTTTA  
TCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCC  
GCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq10 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 3- PTAP 2**

CTGGCTGTCTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAA  
TACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGA  
CAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAA  
TAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTGC  
GGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATG  
GCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTTTACCACCAATGCGGCTCATT  
TGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAAACACG

**>Seq11 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 4- PTAP 2**

GACACATCTGTTCATCACGCGAGCGAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGATAA  
ACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCGTAACAACAACCAACAAAAACAGCGCTC  
AAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACAG  
AAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTGCTGGCGGCAAAGACACG  
GTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGGA  
GGGTATAAAGCTTCTTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGGC  
GGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq12 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 7- PTAP 2**

GTCAGGCTTCTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGATA  
AACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAAACAGCGCTC  
AAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACAG  
AAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTGCTGGCGGCAAAGACACG  
GTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGGA  
GGGTATAAAGCTTCTTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGGC  
GGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq13 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 8- PTAP 2**

GGATCTTTGTAAGCCAGTAATTGGTGGTAGAGAAGCTTTATACCCTCCCCTCT  
AATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAACCGTGTCTTT  
GCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTGTTTTTTG  
CGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGCGCTGTT  
TTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTATCCTTATGTT  
TATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCGCTTTGCC  
ACAAATCCAGTGTGCCT

**>Seq14 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 13- PTAP 2**

CATCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCTACTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT  
GCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT

GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq15 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 15- PTAP 2**

TCAATTCTGACGATCGCGTGTGCCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCC  
TCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAAC  
CGTGCTTTTGCCGCCCGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTT  
CTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTG  
ACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCAC  
TTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGA  
TAATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq16 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 16- PTAP 2**

CGTCGTTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGCTTTTGCCGCCCGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCGGGTGTGCCA

**>Seq17 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 17- PTAP 2**

CGGGAGCCGATAATTATCGCCCCTCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAA  
GGATAAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAG  
CGCTCAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAA  
AACAGAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCTGGCGGCAAG  
ACACGGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAG  
TGGGAGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCA  
AAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq18 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 21- PTAP 2**

ATTTTCATGCTGTGTCTGTGAACTGCCTTGATCCTGTGTGCACGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGCTTTTGCCGCCCGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq19 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 23- PTAP 2**

AAACATGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCGT

GTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTGT  
TTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACTG  
CTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTTG  
AGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAAT  
GTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCA

**>Seq20 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 24- PTAP 2**

CATCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCGT  
GTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTGT  
TTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACTG  
CTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTTG  
AGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAAT  
GTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCTAGTGTGCCAAGT

**>Seq21 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 38- PTAP 2**

CGTTGTGTTTCTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAA  
TACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGA  
CAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAA  
TAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGC  
GGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATG  
GCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
TGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq22 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 40- PTAP 2**

TGGCCTCTTTTACTGTATCGCATCCTCCACGAGGTGGCTATAAGGATAAACCCA  
ATAATACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAA  
ACGACAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCAC  
CCAATAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTT  
TTGCGGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCT  
GATGGCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGC  
TCATTTGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAGC  
CA

**>Seq23 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 4- PTAP 3**

AAATCTGGACGATTTCGCATGGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCC  
TCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTT  
CTGTTTTTTCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTG  
AGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGCTGGTGTACTAGGTTTA  
TCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCC  
CGCCTTTCACAAACCCGGTGTGCCA

**>Seq24 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 6- PTAP 3**

CCCAAGGCTACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGAT  
AAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCGCT  
CAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACA  
GAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCTGGCGGCAAAGACAC  
GGTTGTCAATATTGATCGCATCAACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGG  
AGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTGTCATATCGGCAAAGG  
CGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAATCA

**>Seq25 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 7- PTAP 3**

AGTCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCGT  
GTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTGT  
TTTTTGC GCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGTTGTTGTTAGCATTATTTTGC GTGGTGT TACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq26 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 8- PTAP 3**

AAGTTTTCTGGACGATACGCATGTGGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATA  
CCCTCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGAC  
AACCGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGA  
TTTCTGTTTTTGC GCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTT  
TTGAGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTGC GTGGTGT TACTAGG  
TTATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCC  
CCGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq27 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 9- PTAP 3**

CATGGATGAAGCTGATTGCATATTGATGAGCCTGGCACGAATACCAGTAGGCG  
TCTCTATACCCTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCA  
ATATTGACAACCGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTG  
GGTTGGATTTCTGTTTTTGC GCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTA  
CTATTGTTTTGAGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTGC GTGGTGT  
TACTAGGTTTATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAAT  
GTTTAGCCCCGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCAA

**>Seq28 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated influent water sample 10- PTAP 3**

GATCTGGGACAGATCGCGTGTAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACC  
CTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATT  
TCTGTTTTTGC GCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTT  
GAGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTGC GTGGTGT TACTAGGTTT

ATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCC  
CGCGCTTTGCCACAAACCTGGTGTGCCAAT

**>Seq29 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 13- PTAP 3**

CCATTCTGGACGATTTCGCATGTGCGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAAC  
CCTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACA  
ACCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAAC  
TTCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTT  
TGACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
ACTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGC  
GATAATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCAGGTGTGCCAAGA

**>Seq30 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 16- PTAP 3**

CCTCCTTGCATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCGGGTGTGGCCAA

**>Seq31 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 18- PTAP 3**

TGTGGCTGCTCTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAA  
TACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGA  
CAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAA  
TAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGC  
GGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATG  
GCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
TGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAAGCGAGCGA

**>Seq32 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 21- PTAP 3**

AGATTTTGTTAACTTTATTCGGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCA  
ATAATACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAA  
ACGACAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCAC  
CCAATAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTT  
TTGCGGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCT  
GATGGCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGC  
TCATTTGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAAGCGAGCGA

**>Seq33 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 24- PTAP 3**

GTCGGGGTTCTCTATCGCTGCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAA  
TAATACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAA

CGACAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACTCAGGTCATTAACCCACC  
CAATAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTT  
TGCGGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACTAACGCTG  
ATGGCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTC  
ATTTGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq34 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 31- PTAP 3**

ACAATCTTTGCGATTGCAAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACC  
CTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACT  
TCTGTTTTTTCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTT  
GACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
CTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCG  
ATAATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq35 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
influent water sample 38- PTAP 3**

GATGATTGCCGATTGCTATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTACTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCAGTGTGCCA

**>Seq36 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
effluent water sample 1- PTAP 1**

CGTCGTTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTCTG  
TTTTTTCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAACCTGGTGTGCCAAC

**>Seq37 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
effluent water sample 2-DWTP1**

TCTGGCTTGCTATCCCCTCCGAGGCGGTTATGAGAGTAAACTAAAGACACCCC  
TTCTCAAAACAACCCTAAAAATGATGCGCAAAAAACAGAAATTCAACCCACGCA  
AGTCATTGATGGGCCTTTTTCGCGGCGGAAAGACACGGTTGTGAATATTTTCCAC  
TTAAACACTAAAGCCGATGGCACGCTTAAAGCGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTT  
AGCACGAATGCGGCTCATTGGAATATCGGCGAAGGCGGAGTCAATCTGTCCAA  
TCAAGCGAGCGAACCAAAATGCCGTGTGTTAGAATATCGGCAAAGGCGGTGT  
CAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAGCTTTG

**>Seq38 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated  
effluent water sample 3- PTAP 1**

CCAGGGCACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGATAA  
ACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCGCTCA  
AAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACAGA  
AATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTCTGGCGGCAAAAGACACGG  
TTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGGAG  
GGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGGCG  
GTGTCAATCTGTCCATAAAGGCGAGCGA

**>Seq39 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 4- PTAP 1**

TATCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCGT  
GTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTGT  
TTTTTGC GCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTGC GTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAACCCGGTGTGCC

**>Seq40 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 5- PTAP 1**

CATCCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGC GCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACT  
GCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCTGGGGTGCCA

**>Seq41 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 6- PTAP 1**

CATCGTTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTG  
TTTTTTGC GCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTGC GTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAATCCCAGTGTGCCAA

**>Seq42 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 7- PTAP 1**

CGAAGTGGTACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGA  
TAAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCGC  
TCAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAAC  
AGAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTCTGGCGGCAAAAGACA  
CGGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGG  
GAGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAG  
GCGGTGTCAATCTGTCCAATAAAGCGAGCGA

**>Seq43 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 9- PTAP 1**

CTACATCGTTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACC  
CTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATT  
TCTGTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTT  
GAGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGTTTT  
ATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCC  
CGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCC

**>Seq44 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 10- PTAP 1**

CGTCATGGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCT  
GTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAG  
CGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGTTTTATC  
CTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGC  
GCTTTGCCACAAACCCGGTGTGCCAA

**>Seq45 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 11- PTAP 1**

GCAAGGTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAGCCGAGCGACCCACGGT  
G

**>Seq46 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 12- PTAP 1**

CATCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCGT  
GTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTGT  
TTTTTTCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAACCCGGTGTGCC

**>Seq47 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 13- PTAP 1**

CCTCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT

GCTCTCTTGTTTGTCTGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCTGTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCAAGTGTGCCAAT

**>Seq48 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 16- PTAP 1**

GGGATTGGTTTTCTTAATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAA  
TAATACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAA  
CGACAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACC  
CAATAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTT  
TGCGGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTG  
ATGGCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTC  
ATTTGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq49 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 23- PTAP 1**

CCTCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT  
GCTCTCTTGTTTGTCTGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCTGTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCAGGGGTGCCAATG

**>Seq50 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 24- PTAP 1**

GATCGTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT  
GCTCTCTTGTTTGTCTGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCTGTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCGGTGTGCC

**>Seq51 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 2- PTAP 2**

AAAAGTATTGCATAGTACAATTGACATTGTTGGTAGAGAAGCTTTATACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCGT  
GCTTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGATTCTGT  
TTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq52 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 3- PTAP 2**

CCAGGGCACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGATAA  
ACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAAACCAACAAAACAGCGCTCA  
AAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACAGA  
AATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTCTGGCGGCAAGACACGG  
TTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGGAG  
GGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGGCG  
GTGTCAATCTGTCCATAAAGGCGAGCGA

**>Seq53 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 4- PTAP 2**

TATCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTG  
TTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAACCTGGTGTGCCAAT

**>Seq54 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 6- PTAP 2**

CGTCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTG  
TTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAACCCGGTGTGCC

**>Seq55 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 7- PTAP 2**

TCCTAGCTAAGCGTGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTCCCAC  
TCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCGTGTG  
TTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTGTTTT  
TTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGCGCT  
GTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTTATCCTTAT  
GTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCGCTTT  
GCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq56 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 9- PTAP 2**

CATCATTGCCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCT  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCT  
GTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAG  
CGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTTATC  
CTTATGTTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCG  
GCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCAATCA

**>Seq57 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 11- PTAP 2**

CATCCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCAGCAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCT  
GTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAG  
CGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTTGGTGTACTAGTTTTATC  
CTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGC  
GCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCAA

**>Seq58 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 12- PTAP 2**

CGCCCGGCTACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGA  
TAAACCTAGTAACACCACGCAAAATAATGCTAACAAACAACCAACAAAACAGCGC  
TCAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAC  
AGAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTCTGGCGGCAAGACA  
CGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGG  
GAGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAG  
GCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq59 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 13- PTAP 2**

AGGTTCTTTTTCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAAC  
CCTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACA  
ACCGTGTCTTTGCCGCCGCAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAAC  
TTCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTT  
TGACTGCTCTTTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
ACTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGC  
GATAATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq60 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 15- PTAP 2**

CATCATGCCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCCTC  
CCTCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCGCAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT  
GCTCTCTTTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCAGTGTGCCAA

**>Seq61 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 16- PTAP 2**

CGGGAAGTTTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATA  
ATACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACG  
ACAAACAAGAGAGCAGTCAAATAAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCA  
ATAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTG  
CGGGCGGCAAAAGACACGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGAT

GGCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCAT  
TTGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq62 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 17- PTAP 2**

ACTTTTTCAATCTTCATACCGACCTCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGG  
ATAAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCG  
CTCAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAA  
CAGAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCTGGCGGCAAAGAC  
ACGGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTG  
GGAGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAA  
GGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq63 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 23- PTAP 2**

CGTCGTTGGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACC  
CTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACT  
TCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTT  
GACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
CTTTGAGAAGGGGTATTATTGTGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCG  
ATAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq64 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 24- PTAP 2**

GCGAGGCTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAAT  
ACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGAC  
AAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAAT  
AGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq65 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 31- PTAP 2**

CAACGTCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACAC  
CTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACT  
TCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTT  
GACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
CTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCG  
ATAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq66 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 2- PTAP 3**

GATCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG

TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT  
GCTCTTTGTTTGTGTTTTAGCGCTTTTCATTTTTGTCGTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq67 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 3- PTAP 3**

GGAAGGGCTACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGA  
TAAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCGC  
TCAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAAC  
AGAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGTGGCGGCAAAGACA  
CGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGG  
GAGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAG  
GCGGTGTCAATCTGTCCATAAAAAGCGAGCGAGCCTAGCCTCCAGTGTGCCAT  
GCCA

**>Seq68 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 4- PTAP 3**

CGTCCTTTGCCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCC  
TCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTT  
CTGTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTG  
AGCGCTGTTTTGTTGTTGTTGTTAGCATTATTTTGCCTGGTGTACTAGGTTTA  
TCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCC  
GCGCTTTGCCACAAACCCGGTGTGCC

**>Seq69 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 6- PTAP 3**

ACCTGCTACTTATCGCCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGATA  
AACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCGCTC  
AAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACAG  
AAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGTGGCGGCAAAGACACG  
GTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGGA  
GGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGGC  
GGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAGCCA

**>Seq70 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 7- PTAP 3**

CATCCGTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCCTC  
CCTACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACT  
GCTCTTTGTTTGTGTTTTAGCGCTTTTCATTTTTGTCGTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCCTTTGCCACAAACCCGGGGTGCCAA

**>Seq71 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 9- PTAP 3**

CCCAGGCTACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGATA  
AACCTAGTAACACCACGCAAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGCGCTC  
AAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACAG  
AAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCTGGCGGCAAAGACACG  
GTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGGA  
GGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGGC  
GGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAGAAGA

**>Seq72 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 10- PTAP 3**

AATTCCTTGCGATTGCATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCCAA

**>Seq73 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 11- PTAP 3**

ACCAGGCTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAGCGAGCGAACAT

**>Seq74 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 16- PTAP 3**

AGAGGTACTIONTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATACC  
CCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAAA  
CAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGT  
GCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCGCGG  
CGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGCA  
CGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGC  
ATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAGCGAGCGAGTAGC

**>Seq75 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 25- PTAP 3**

CCTTCGTTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT

TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCCAAT

**>Seq76 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 26- PTAP 3**

AATCCGTTGCTGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCC  
TCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTT  
CTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTG  
ACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCAC  
TTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGA  
TAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCCA

**>Seq77 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated effluent water sample 31- PTAP 3**

ACCAGGCTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAAT  
ACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGAC  
AAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAAT  
AGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAAGCGAGCGAATCA

**>Seq78 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 3- PTAP 1**

GATCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCCTC  
CCTACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTTCTG  
TTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTGCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq79 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 18- PTAP 1**

CGAGTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATACCC  
CTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAAAC  
AAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGTG  
CGAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCGGGC  
GGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGCAC  
GATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTGCA  
TATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAGACC

**>Seq80 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 21- PTAP 1**

CTAACATCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAAC  
CCTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACA

ACCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAAC  
TTCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTT  
TGACTGCTCTTTGTTTGTCTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
ACTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGC  
GATAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq81 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 22- PTAP 1**

CCTCATGGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
GCTCTCTTGTGTTTGTCTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCGGGTGTGCCAAC

**>Seq82 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 24- PTAP 1**

CACTTCTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATAC  
CCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAA  
ACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAG  
TGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCGGG  
GCGGCAAAGACACGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGC  
ACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTG  
CATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAAGCGAGCGA

**>Seq83 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 26- PTAP 1**

CAGATCTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
TGCTCTCTTGTGTTTGTCTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCAGTGTGCCAA

**>Seq84 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 3- PTAP 2**

AATCATTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
TGCTCTCTTGTGTTTGTCTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCCGTGTGCCAA

**>Seq85 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 6- PTAP 2**

CGATGCTGATAGATCGTGCGTGCCAGCATTGGTGGTAGAGAAGCTTTATACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTCT  
GTTTTTTCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAG  
CGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGCTGGTGTACTAGTTTTATC  
CTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGC  
GCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq86 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 7- PTAP 2**

CATCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCACTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCGGGTGTGCCA

**>Seq87 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 16- PTAP 2**

CCATCATTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCC  
TCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTT  
CTGTTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTG  
ACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCA  
TTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGA  
TAATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACACGGGTGCCAAGT

**>Seq88 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 17- PTAP 2**

GGCAGTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATAC  
CCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAA  
ACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAG  
TGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCTTTTTCGGG  
GCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGC  
ACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTG  
CATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAAGGCGAGCAGAGCCA

**>Seq89 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 21- PTAP 2**

CCTCCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCACTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCTGTGTGCCAAC

**>Seq90 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 22- PTAP 2**

TTTAGTCGTGCGCTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCACTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq91 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 53- PTAP 2**

AATTCGTGGGGCTTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCACTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCA

**>Seq92 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 3- PTAP 3**

TTTAATCTTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACC  
CTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATT  
TCTGTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTT  
GAGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTTGGTGTACTAGGTTT  
ATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCC  
CGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCA

**>Seq93 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 4- PTAP 3**

AATCCGTGTGGCTTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCACTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq94 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 7- PTAP 3**

CCCCTTCCAACCTTATCGCCCTCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGAT  
AAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAAACAACCAACAAAACAGCGCT  
CAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCAATAGCGCGCAAAAAACA  
GAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGTCTGGCGGCAAGACAC  
GGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGG

AGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTGTCATATCGGCAAAGG  
CGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq95 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 10- PTAP 3**

TGACCAAAGTCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTA  
TACCCTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGGATGCGATCAATATTG  
ACAACCGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCCTGGGTTG  
GATTTCTGTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTG  
TTTTGAGCGCTGTTTTGTTGTTGTTGTTAGCATTATTTTGCCTGGTGTACTAG  
GTTTATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAG  
CCCCGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGC

**>Seq96 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 13- PTAP 3**

GAGGGTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATAC  
CCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAA  
ACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAG  
TGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCGG  
GCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGC  
ACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTG  
CATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCACAAAGCCCGAGCGAGATA

**>Seq97 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 16- PTAP 3**

AGTCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCCTC  
CCTTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCCTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
GCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCC

**>Seq98 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 21- PTAP 3**

CCGAGGTTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAAGCGAGCGA

**>Seq99 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 22- PTAP 3**

AAATCTTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCCT  
CCCCTTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGGATGCGGTTGATATTGACAACC

GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCAA

**>Seq100 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 24- PTAP 3**

GCAGTACTTATCGCTCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATACCC  
CTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAAAC  
AAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGTG  
CGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCGGGGC  
GGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGCAC  
GATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCA  
TATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAAGCCGAGCGAGCCAGT

**>Seq101 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 26- PTAP 3**

CGTCATGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCGT  
GCTTTTTCGCCGCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTGT  
TTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACTG  
CTCTCTTGTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTTG  
AGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAAT  
GTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCGGGTGTGCCCA

**>Seq102 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 45- PTAP 3**

GGATGCTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCGG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAGGCGAGCGATAGAGC

**>Seq103 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture influent water sample 50- PTAP 3**

CATCATGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
GCTCTCTTGTGTCGTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAAGTGTGCCCA

**>Seq104 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 3- PTAP 1**

GATCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCTC  
CCTACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAACCG  
TGCTTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTCTG  
TTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAGC  
GCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTTATCC  
TTATGTTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGCG  
CTTTGCCACAAACCAAGTGTGCCA

**>Seq105 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 6- PTAP 1**

CGATCCTTTGCGAATGCAAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACC  
CTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGATCAATATTGACAA  
CCGTGTCTTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATT  
TCTGTTTTTTGCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTT  
GAGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGTGGTGTACTAGGTTT  
ATCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCC  
CGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq106 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 14- PTAP 1**

GCGTACTTATCGCTCCTCCAGAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATACCCC  
TTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAAACA  
AGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGTGC  
GCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCGGGCG  
GCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGA  
TTAGAGTGGGAGGGTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATA  
TCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAGGCGAGCGA

**>Seq107 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 15- PTAP 1**

CATCTTGCCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCGGGGTGCCAGA

**>Seq108 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 18- PTAP 1**

AATCATTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCCGTGTGCCAA

**>Seq109 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 21- PTAP 1**

AATCATTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACT  
GCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCCCA

**>Seq110 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 22- PTAP 1**

AGATCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCA

**>Seq111 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 24- PTAP 1**

GCCAGGCTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAAT  
ACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGAC  
AAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAAT  
AGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATAAAAGCGAGCGAGTAGC

**>Seq112 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 26- PTAP 1**

TGTCCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCGGTGTGCCA

**>Seq113 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 43- PTAP 1**

CGGTCTACTTCTACGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG

CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAAGCGAGCGA

**>Seq114 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 3- PTAP 2**

GATCGTTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAAC  
GTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATTCT  
GTTTTTTCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTGAG  
CGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGCTGGTGTACTAGTTTTATC  
CTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCCGC  
GCTTGGCCACAAATCCAGTGTGCCA

**>Seq115 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 4- PTAP 2**

AATCGTTTGACGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTATACCC  
TCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGATCAATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCAGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGGATT  
CTGTTTTTTCGCGCTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTGTTTTG  
AGCGCTGTTTTGTTGGTTGTTGTTAGCATTATTTTTCGCTGGTGTACTAGGTTTA  
TCCTTATGTTTATCCTTATAACCGCCTTCTGGAGGGGCGATAATGTTTAGCCCC  
GCGCTTGGCCACAAACCAGTGTGCCA

**>Seq116 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 14- PTAP 2**

GGAGGGTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTTCG  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAAAGGCGGAGCAAAGA

**>Seq117 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 15- PTAP 2**

CGTCCGTTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCC  
TCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAAC  
CGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTT  
CTGTTTTTTCGCGACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTG  
ACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCAC  
TTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGA  
TAATGTTTAAACCCGGCGCTTGGCCACAAACCCAGTGTGCCAT

**>Seq118 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 18- PTAP 2**

GCTCCTTGCATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCCTC  
CCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTGATGCGGTTGATATTGACAACCG

TGTCTTTGCCGCCCACAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACT  
GCTCTTTGTTTGTGCTTTTTAGCGCTTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCAGGTGTGCCAGGA

**>Seq119 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 23- PTAP 2**

CATTTTCGGTTATCGCTCTCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATACC  
CCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAAA  
CAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGT  
GCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGC  
CGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGCA  
CGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGC  
ATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGAGGAC

**>Seq120 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 24- PTAP 2**

AGACGGCTCTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATA  
CCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACA  
AACAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATA  
GTGCGCAAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGC  
GGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGG  
CACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTT  
GCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCATAAAAGGCGAGCGAAACA

**>Seq121 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 29- PTAP 2**

CCTCCATGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCACAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACT  
GCTCTTTGTTTGTGCTTTTTAGCGCTTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCTGGTGTGCCAAG

**>Seq122 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 3- PTAP 3**

CTGCTTTCTACTTATCGCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAGGAT  
AAACCTAGTAACACCACGCAAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAAACAGCGCT  
CAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAAACA  
GAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGTCTGGCGGCAAAGACAC  
GGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAACGCTGATGGCACGATTAGAGTGGG  
AGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTTGCATATCGGCAAAGG  
CGGTGTCAATCTGTCCAATAAAGCGAGCGAACGA

**>Seq123 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 4- PTAP 3**

AAAGAGGTTGCGCTTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACC  
CTCCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCCTGGGTTGAACT  
TCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTT  
GACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
CTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCG  
ATAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

**>Seq124 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 6- PTAP 3**

GGCCTTTTCTTTCTTATCGCCCCTCCAGAAGGCGGTTATAAGGATAAACATAAG  
GATAAACCTAGTAACACCACGCAAATAATGCTAACAACAACCAACAAAACAGC  
GCTCAAAACAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAGCGCGCAAAAA  
ACAGAAATCCAACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGCTGGCGGCAAAGA  
CACGGTTGTCAATATTGATCGCATCAACTAACGCTGATGGCAGCATTAGAGT  
GGGAGGGTATAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTGTCATATCGGCAA  
AGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGA

**>Seq125 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 14- PTAP 3**

CCTCATGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTCC  
CACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCGT  
GTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCCTGGGTTGAACTTCTGT  
TTTTTGCCTACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACTG  
CTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTTG  
AGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAAT  
GTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCTAGTGTGCCCATCTG

**>Seq126 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 16- PTAP 3**

CATCATTGCCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCCTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCGGGTGTGCCA

**>Seq127 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 18- PTAP 3**

CATCCATTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCCTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTACT  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCCCGTGTGCCCA

**>Seq128 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 23- PTAP 3**

CCTCGTTGCGAATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAGAGAAGCTTTAAACCCTC  
CCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCG  
TGTCTTTGCCGCCCCGAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTG  
TTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGACT  
GCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTT  
GAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAA  
TGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCGGTGTGCCAAC

**>Seq129 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 24- PTAP 3**

CGTCGTTGCGATATGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCCGAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAACCGGTGTGCCAAC

**>Seq130 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 26- PTAP 3**

TAGTATTATTTACTTTTTCGCTCCTCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAA  
TACCCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGA  
CAAACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTACCCACCCAA  
TAGTGCGCAAAAAACAGAAGTTCACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGC  
GGGCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATG  
GCACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATT  
TGCATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAATCAAGCGAGCG

**>Seq131 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 28- PTAP 3**

AGGATCGTTGCGATTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACC  
CTCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAA  
CCGTGTCTTTGCCGCCCCGAAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACT  
TCTGTTTTTTGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTT  
GACTGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACC  
CTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCG  
ATAATGTTAAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCAAC

**>Seq132 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 29- PTAP 3**

CAGGCTACTTATCGCTCCTCCAGAAGGTGGCTATAAGGATAAACCCAATAATAC  
CCCTTCTCAAAGTGGTGCTAAAAACGACAAAAATGAAAGCGCTAAAAACGACAA  
ACAAGAGAGCAGTCAAATAATAGTAACACTCAGGTCATTAACCCACCCAATAG  
TGCGCAAAAAACAGAAGTTCACCCACGCAAGTCATTGATGGGCCTTTTGGCG  
GCGGCAAAGACACGGTTGTCAATATCAACCGCATCAACACTAACGCTGATGGC

ACGATTAGAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTCTTACCACCAATGCGGCTCATTG  
CATATCGGCAAAGGCGGTGTCAATCTGTCCAACAAAGCGAGCGA

**>Seq133 [organism=Helicobacter pylori] vacA gen, partial sequence, isolated culture effluent water sample 38- PTAP 3**

CCTTGTCTGTGTGTGCAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCT  
CCCACTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACC  
GTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCT  
GTTTTTGC GCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGAC  
TGCTCTCTTGTGTTGTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTT  
TGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATA  
ATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCC

## **ANEXO VII. Publicaciones**



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijheh](http://www.elsevier.com/locate/ijheh)

### Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques

Fidson-Juarismy Vesga<sup>a,b</sup>, Yolanda Moreno<sup>b,c</sup>, María Antonia Ferrús<sup>c</sup>, Claudia Campos<sup>a</sup>, Alba Alicia Trespalacios<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Microbiology Department, Science Faculty, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 110231, Colombia

<sup>b</sup> Research Institute of Water Engineering and Environment (IAMA), Universitat Politècnica de València, Valencia, 46022, Spain

<sup>c</sup> Microbiology Department, ETSIAM, Universitat Politècnica de València, Valencia, 46022, Spain



#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

*Helicobacter pylori*

Detection

Culture

qPCR

FISH

Drinking water treatment plants

#### ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is one of the most common causes of chronic bacterial infection in humans, and a predisposing factor for peptic ulcer and gastric cancer. The infection has been consistently associated with lack of access to clean water and proper sanitation. *H. pylori* has been detected in surface water, wastewater and drinking water. However, its ability to survive in an infectious state in the environment is hindered because it rapidly loses its cultivability. The aim of this study was to determine the presence of cultivable and therefore viable *H. pylori* in influent and effluent water from drinking water treatment plants (DWTP). A total of 310 influent and effluent water samples were collected from three drinking water treatment plants located at Bogotá city, Colombia. Specific detection of *H. pylori* was achieved by culture, qPCR and FISH techniques. Fifty-six positive *H. pylori* cultures were obtained from the water samples. Characteristic colonies were covered by the growth of a large number of other bacteria present in the water samples, making isolation difficult to perform. Thus, the mixed cultures were submitted to Fluorescent *In situ* Hybridization (FISH) and qPCR analysis, followed by sequencing of the amplicons for confirmation. By qPCR, 77 water samples, both from the influent and the effluent, were positive for the presence of *H. pylori*. The results of our study demonstrate that viable *H. pylori* cells were present in both, influent and effluent water samples obtained from drinking water treatment plants in Bogotá and provide further evidence that contaminated water may act as a transmission vehicle for *H. pylori*. Moreover, FISH and qPCR methods result rapid and specific techniques to identify *H. pylori* from complex environmental samples such as influent water.

#### 1. Introduction

*Helicobacter pylori* is a pathogenic bacterium which colonizes human gastric mucosa, and is known to affect > 50% of the world population (Aziz et al., 2015; Khean-Lee et al., 2011; USEPA, 2015a, 2015b). According to Hooi et al. (2017) there were approximately 4.4 billion individuals with *H. pylori* infection worldwide in 2015. Prevalence is highest in Africa (79.1%), Latin America and the Caribbean (63.4%), and Asia (54.7%). In contrast, HP prevalence is lowest in Northern America (37.1%) and Oceania (24.4%). In Colombia, 77–80% of the population is infected (Campuzano-Maya et al., 2007). Infection with this bacterium has been associated with the development of chronic gastritis, peptic ulcer disease, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, B cell MALT lymphoma and gastric adenocarcinoma (Baker et al., 2016). In 1994, *H. pylori* was classified as a Group 1 carcinogen by the

WHO International Agency for Research on Cancer (International Agency for Research on Cancer (IARC, 1994). The clinical outcome of *H. pylori* infection has been associated with the presence of specific *H. pylori* virulence factors, including cytotoxin-associated gene A (CagA) and the vacuolating cytotoxin (VacA) (Winter et al., 2014). The Vacuolating cytotoxin A secreted by *H. pylori* enhances the ability of the bacteria to colonize the stomach and contributes to the pathogenesis of gastric adenocarcinoma and peptic ulcer disease.

Currently, the route of transmission of *H. pylori* remains unclear, evidence supporting both the fecal-oral and oral-oral route (Leja et al., 2016). Several authors have suggested that fecal-oral transmission occurs through drinking water supplies, groundwater, recreational waters, freshwaters streams, and estuary and marine waters contaminated by sewage (Carbone et al., 2005; Cellini et al., 2004; Cunachi et al., 2015; Mazarri-Hiriart et al., 2001; Moreno et al., 2003; Santiago et al.,

\* Corresponding author at: Research Institute of Water and Environmental Engineering IAMA, Ed. 8G, Acceso D, Plaza 2, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

E-mail address: [y.moreno@upvnet.upv.es](mailto:y.moreno@upvnet.upv.es) (Y. Moreno).

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.010>

Received 14 February 2018; Received in revised form 12 April 2018; Accepted 29 April 2018  
1438-4639/© 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## ANEXO VIII. Formato de Cadena de Custodia - DM-LIAL-F024

 <p>Pontificia Universidad <b>JAVERIANA</b> Bogotá</p>		<b>CADENA DE CUSTODIA</b>		CODIGO: <b>DM-LIAL-F 024</b>		
				VERSIÓN: 03		
				VIGENTE: 2013-02-01		
<b>LABORATORIO DE INDICADORES DE CALIDAD DE AGUAS Y LODOS</b>						
ZONA DE MUESTREO						
DIRECCION TOMA MUESTRA						
NOMBRE SOLICITANTE						
EMPRESA						
E-MAIL EMPRESA						
<b>INFORMACION DE LA MUESTRA</b>						
TIPO DE MUESTRA:	Agua Potable	Agua Residual	Lodo	Biosolido	Suelo	Vegetales
	Otro	Cual:				
Fecha:		Hora:		Muestra:	Puntual	Compuesta
Numero de recipientes:		Contramuestra:	Si	No		
<b>Dosificaciones:</b> (Cantidad y frecuencia de aplicación de reactivos que se utilicen para la potabilización o mantenimiento del agua de piscina o tratamiento de aguas residuales. Se deben informar en unidades de masa (g, mg, kg etc.) o volumen (L, mL, µl etc).)						
El análisis lo solicita directamente la empresa o un tercero. Cuál ?						
<b>Descripción climática:</b> (Hace referencia a la temperatura, al registro o no de precipitaciones (lluvia) y a la radiación solar en el lugar de muestreo. Cuando aplica)						
<b>Responsable Toma de Muestra:</b> (En caso de que la cadena de custodia sea enviada vía mail, la firma debe ser electrónica o escaneada)						
Nombre:		Cédula:				
Entidad:		Teléfono:				
Cargo:		Móvil:				
Firma e Identificación:						
<b>Recepción de la muestra</b>						
Nombre:				Temperatura de Conservación:		
Fecha:		Hora:		Muestra Conforme:		
Firma e Identificación						
<b>ANÁLISIS A REALIZAR</b>						
<b>Microbiológicos</b>						
<b>Coliformes Fecales</b>			<b>Salmonella spp.</b>			
Numero Mas Probable NMP		Filtración por Membrana		Numero Mas Probable NMP		
<b>Escherichia coli y Coliformes totales</b>		<b>Enterococos</b>		<b>Clostridium</b>		
Filtración por Membrana		Filtración por Membrana		Filtración por Membrana		
<b>Fagos Somáticos</b>		<b>Fagos F Especificos</b>		<b>Fagos Bacteroides fragilis</b>		
<b>Recuento de Giardia spp y Cryptosporidium spp</b>			<b>Huevos de Helminto</b>			
<b>Bioensayos</b>						
Hydra attenuata		Daphnia magna		Eisenia foetida		
Lactuca sativa		Selenastrum spp		Vibrio fischeri		
<b>Observaciones:</b>						
<b>NOTA:</b> Favor diligenciar todos los espacios del presente formato. En caso excepcional coloque la palabra <b>NO APLICA</b>						
La cadena de custodia debe llegar con la muestra o ser enviada al laboratorio antes que ésta llegue, de lo contrario <b>NO SE RECIBIRÁ LA MUESTRA</b>						
Carrera 7ª 43-82, Edificio Angel Valtierra S.J. (51). Laboratorio 235. Telefono 3208320 ext. 4156 ó 4165, Bogotá D.C –Colombia						